

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології**

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва субстанції моноклональних антитіл,
специфічних до білку HBsAg вірусу гепатиту В. Дільниця культивування»**

Виконав:

студент IV курсу, групи БТ-61

Шебеда Дмитро Сергійович _____

Керівник:

Ст. викладач

Дзигун Лариса Петрівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Доцент, к.т.н.

Шибєцький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

Посада, науковий ступінь, вчене звання,

Прізвище, ім'я, по батькові _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП БТ6123 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Шебеда Д. С.			Відомість дипломного проекту	Лист	Листів
Керівн.	Дзигун Л. П.				1	1
Консуль т.	Шибецький В. Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-61	
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ
на дипломний проєкт студенту
Шебеді Дмитру Сергійовичу

1. Тема проєкту «Технологія виробництва субстанції моноклональних антитіл, специфічних до білку HBsAg вірусу гепатиту В. Дільниця культивування», керівник проєкту Дзигун Лариса Петрівна, ст. викладач, затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту 11 червня 2020 року.

3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент гібридизованих клітин мишачої мієломи та спленоцитів попередньо імунізованих мишей 95E1; середовище культивування – безсироваткове DMEM; ферментер для промислового культивування – картриджі половолоконного типу; параметри культивування: $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,3$; витрата поживного середовища 12 л/год, $\tau=8$ діб; спосіб очистки продукту – афінна хроматографія з білком А-сефарозою; кінцевий продукт – очищена фракція моноклональних антитіл суспензована у фосфатно-сольовому розчині в концентрації 6,8 мг/мл у кріоампулах.

4. Зміст пояснювальної записки: обґрунтування вибору та характеристика промислового продуцента для виробництва моноклональних антитіл; визначення основних напрямків застосування препаратів на основі антитіл; літературний аналіз вихідної технології отримання гібридних клітин з подальшим описом масового напрацювання моноклональних антитіл; визначення фізико-хімічних характеристик кінцевого продукту;

розрахунок матеріального балансу та розробка технологічної та апаратурної схем виробництва; обґрунтування вибору конструкції та типу ферментеру; наведення технологічного, конструктивного та гідравлічного розрахунків обраного апарату.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1.

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибєцький В.Ю., доц. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання 11 березня 2020 року.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Ознайомлення з тематикою роботи. Написання вступу.	20.03.2020	
2.	Розділ 1. Характеристика біологічного агента. Обґрунтування вибору продуцента.	03.04.2020	
3.	Розділ 2. Біологічні основи виробництва. Хіміко-біологічна структура антитіл.	10.04.2020	
4.	Розділ 3. Методи отримання промислових продуцентів. Літературний аналіз технології виробництва.	24.04.2020	
5.	Розділ 4. Технологічна частина. Характеристика кінцевої продукції. Матеріальний баланс та контроль виробництва.	08.05.2020	
6.	Графічне зображення технологічної схеми виробництва.	15.05.2020	
7.	Розділ 5. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу.	22.05.2020	
8.	Створення апаратурної схеми та креслення ферментеру загального виду	29.05.2020	
9.	Оформлення пояснювальної записки, анотацій та реферату.	05.06.2020	

Студент

Дмитро ШЕБЕДЯ

Керівник

Лариса ДЗИГУН

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва субстанції
моноклональних антитіл, специфічних до білку HBsAg
вірусу гепатиту В. Дільниця культивування»

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт: 135 с., 26 рис., 12 табл., 13 формул, 90 посилань.

Робота присвячена уніфікації та вдосконаленню технології масового напрацювання виробництва моноклональних антитіл у біореакторі, шляхом іммобілізації клітин продуцента на поверхні напівпроникних мембран та перфузійного типу подачі поживного середовища.

На основі порівняльних характеристик, основним продуцентом було обрано найбільш стабільний та високо імуногенний штам гібридомних клітин, отриманих шляхом злиття клітин мієломи та спленоцитів мишачого походження. Штам 95E1 характеризується титром 1:1000 у культуральній рідині та ізотопом антитіл Ig G_{2a}. У роботі наведений опис основних етапів технології з наведенням біохімічних характеристик та фізико-хімічних параметрів.

Серед конструкцій біореакторів, що використовуються в технології, було обрано мембранний ферментер поволоконного типу, культивування в якому забезпечує високий вихід цільового продукту. На основі наявної моделі біореактору, було проведено технологічні, конструкційні та гідравлічні розрахунки, з метою модернізації технологічних параметрів та виробничих показників.

ГІБРИДОМНА ТЕХНОЛОГІЯ, ГІБРИДОМА, МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА, ІМУНІЗАЦІЯ, КЛОНУВАННЯ, КУЛЬТИВУВАННЯ, МАСОВЕ НАПРАЦЮВАННЯ, ХРОМАТОГРАФІЧНА ОЧИСТКА.

INFORMATIVE ABSTRACT

Diploma work: 135 p., 26 figures, 12 tables, 13 formulas, 90 references.

The work is devoted to the unification and improvement of the technology of mass production of monoclonal antibodies in the bioreactor, by immobilization of producer cells on the surface of semipermeable membranes and perfusion type of nutrient medium.

Based on comparative characteristics, the main producer was selected by the most stable and highly immunogenic strain of hybridoma cells obtained by fusion of myeloma cells and splenocytes of mouse origin. Strain 95E1 is characterized by a titer of 1: 1000 in the culture fluid and an isotope of Ig G_{2α} antibodies. Presented data describes the main stages of technology with biochemical characteristics and physicochemical parameters.

From between of the designs of bioreactors used in the manufacturing technology, based on the index of a high yield of the target product, was chosen membrane bioreactors with hollow fiber cartridges type. In result of using the real model of the bioreactor as prototype, the technological, structural and hydraulic calculations were performed in order to modernize the technological parameters and production indicators.

HYBRIDOMA TECHNOLOGY, HYBRIDOMA, MONOCLONAL ANTIBODIES, IMMUNIZATION, CLONING, BIOSYNTHESIS, MASS PRODUCTION, CHROMATOGRAPHIC PURIFICATION.

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

DMEM - Complete Dulbecco's Modified Eagles Media;

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay;

HBsAg - Hepatitis B surface Antigen;

HEPES – буфер - 4-(2-гідроксиетил) -1-піперазинетансульфонова кислота;

Ig – Immunoglobulin;

RPMI 1640 –середовище - Roswell Park Memorial Institute;

ВГВ – Вірус гепатиту В;

ВП – внутрішньоволоконний простір;

ГАТ - гіпоксантин, аміноптерин та тимідин;

ГВ - гепатит В;

Г/ГФРТ - гіпоксантин-гуанідин-фосфорибозилтрансфераза;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДНК - Дезоксирибонуклеїнова кислота;

ЕТС – ембріональна теляча сироватка;

КУО - колонієутворювальна одиниця;

МВ – міжволоконний простір;

МЗ – мийний засіб;

МкАТ – моноклональні антитіла;

МОЗ – міністерство охорони здоров'я;

ПЕГ – поліетиленгліколь;

РІА – радіоімунний аналіз;

ТК – тимідинкіназа;

ХС – хромово суміш;

ФСБ – фосфатно-сольовий буфер;

ФСБД – фосфатно-сольовий буфер Дюльбека.

ЗМІСТ

Перелік скорочень та умовних позначень.....	7
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
1.1. Принцип гібридомної технології.....	13
1.2. Лінія плазмацитом.....	15
1.3 Вибір експериментальної тварини.....	21
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	25
2.1. Біохімічна структура імуноглобуліну класу G.....	27
2.2. Фізико-хімічні закономірності взаємодії антиген-антитіло.....	27
2.3. Якісні реакції взаємодії антиген-антитіло.....	29
2.4. Методи очистки антитіл.....	29
2.5. Напрямки застосування антитіл.....	32
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	35
3.1. Структура антигену до якого специфічні цільові МкАТ.....	35
3.2. Гібридомна технологія.....	40
3.3. Імунізація тварин.....	42
3.3.1. Приготування суспензії клітин селезінки.....	45
3.4. Гібридизації (злиття) донорних клітин.....	46
3.5. Бактеріальна контамінація гібридом.....	49
3.6. Селекція гібридом.....	49
3.7. Клонування гібридних ліній.....	52
3.8. Масове нарощування МкАТ.....	55
3.8.1. Культуральний супернатант.....	56
3.8.2. Асцитна рідина.....	56
3.8.3. Культивування у біореакторах.....	57
3.9. Збереження клонованих зразків.....	58

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Шебеда Д. С.			<i>ЗМІСТ</i>	Стадія	Арк.
Конс.							8
							135
Керівн.		Дзигун Л. П.				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>	
Затв.							

3.9.1. Заморожування клітин.....	58
3.9.2. Розмороження клітин.....	58
3.10. Очистка антитіл.....	59
3. 11. Блок-схема отримання продуцента.....	60
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	61
4.1 Характеристика кінцевої продукції.....	61
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовується у виробництві.....	62
4.3 Опис технологічного процесу.....	68
4.4 Матеріальний баланс.....	87
4.5 Контроль виробництва.....	94
4.6. Технологічна схема виробництва.....	98
5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	99
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	199
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	105
5.2.1 Моделювання кінетики росту гібридом.....	106
5.2.2. Розрахунок швидкостей споживання глюкози та виділення метаболітів.....	107
5.2.3. Моделювання внутрішньоволоконного простору біореактора.....	109
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання.....	114
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	119
ВИСНОВОК.....	124
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	126

ВСТУП

Важливим показником суспільного розвитку країни, що зображує її соціально-економічний стан та демографічний потенціал суспільства є стан здоров'я населення, яке за останні роки має тенденцію погіршуватися. Головним виконавчим органом санітарного та епідемічного добробуту населення виступає МОЗ, який впроваджує формування та реалізацію державної політики у сфері охорони здоров'я; протидії та захисту суспільства від небезпечних хвороб, шляхом забезпечення суспільства якісними, ефективними та безпечними лікарськими засобами з впровадженням усіх необхідних умов для їх створення, виробництва та контролю якості, керуючись Конституцією та законами України [1, 2].

В останні роки, в Україні спостерігається складна епідеміологічна ситуація, пов'язана з інфікуванням вірусом гепатиту В, яка на разі, є однією з основних причин інвалідизації та смертності населення. За оцінювальними даними, станом на початок 2019 року, в Україні 1,5% (632 298) осіб інфіковано гепатитом В, проте справжня кількість потенційних хворих, значно перевищує реєстровану, оскільки у країні відсутній національний реєстр пацієнтів. Велике число інфікованих осіб, стають хронічними носіями та переносниками вірусу, у більшості випадків, не підозрюючи про це. За оцінкою ВООЗ, кількість хворих у світі досягає 260 млн, а приблизно 2 мільярди людей мають серологічні ознаки інфікування, що обумовлено високою стійкістю збудника у зовнішньому середовищі та широким спектром клініко-епідеміологічних особливостей. Високі показники захворюваності фіксуються, переважно, в економічно-нестабільних регіонах та соціальних прошарках [3, 4].

Визначальними факторами інфікування населення є низький рівень вакцинації; необізнаність громадян, щодо способів передачі вірусу та джерел

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<i>ВСТУП</i>		
Розроб.		Шебеда Д. С.					
Конс.							
Керівн.		Дзигун Л. П.					
Затв.							
					Стадія	Арк.	Аркушів
						10	135
					<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>		

інфікування, а також нехтування профілактичними рекомендаціями [4]. Локалізація збудника в організмі людини зумовлена механізмами передачі інфекції – парентеральними природнім (статевий, вертикальний), штучним (при медичних і немедичних артіфіціальних втручаннях) та гемоконтактним шляхами, спричинений реалізацією прямих і непрямих контактів з кров'ю у побутових умовах. На жаль, у 40% випадків джерело зараження залишається невідомим [4, 5].

Інфекційний процес починається з моменту потрапляння вірусу в кров. Після чого слідує прихована фаза розмноження та накопичення вірусних частинок у гепатоцитах, що супроводжується запальним процесом в паренхімі печінки. Посилаючись тільки на клінічну картину, провести диференціацію між гепатитом В та вірусними гепатитами інших типів неможливо, тому вкрай важливим є лабораторне підтвердження діагнозу. Методи лабораторної діагностики полягають у виявленні поверхневого антигену HBsAg у біологічних рідинах, який свідчить про перебіг захворювання у початковій фазі, а персистенція антигену протягом не менше шести місяців характеризує хронічну форму недуги. Антиген HBsAg є основним маркером інфікування, що відповідає за адсорбцію вірусу на клітинах печінки. [6].

У зв'язку зі швидкою поширеністю парентеральних вірусних гепатитів в Україні, наразі постає питання розробки базових принципів епідеміологічного контролю, сучасних методів діагностики та профілактики, а також проведення інформаційно-аналітичного моніторингу хворих та інфікованих.

Специфічність антитіл до вірусного антигену, зумовлює створення імунопрепаратів і діагностичних імуноферментних тест-систем на основі моноклональних антитіл, що знаходять своє застосування при визначенні імунологічного статусу пацієнтів, діагностиці злоякісних пухлин, скринінгу донорської крові з метою запобігання трансмісивної передачі гепатиту В.

Метою розробки дипломного проєкту є уніфікація та вдосконалення стандартної технології виробництва субстанції моноклональних антитіл специфічних до поверхневого антигену вірусу гепатиту В, шляхом

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		11

напрацюванням субклонів культури гібридних клітин у біореакторах половолоконного типу. Високі показники щільності росту клітин та титру антитіл цільового продукту досягаються внаслідок перфузійного способу культивування та іммобілізацією продуцента на поверхні напівпроникних мембран. Конструктивними перевагами біореактору є велика питома площа росту клітин та мінімізація будь-яких фізичних впливів на культуру.

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		12

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Принцип гібридомної технології

Для багатьох досліджень, пов'язаних із вивченням біологічних структур та практичного застосування їх у якості діагностичних інструментів або компонентів терапевтичних засобів, велику цінність представляють реагенти, що здатні специфічно взаємодіяти з такими структурами. Універсальним реагентом, що володіє вказаною властивістю, вважається молекула імуноглобуліну. Попри те, що імуноглобуліни, будучи антитілами, взаємодіють тільки з антигеном, для більшості структур вдається підібрати специфічні умови, при яких вони метаболічно змінюються – стають антигенами й індукують вироблення комплементарних антитіл (наприклад, при кон'югації з сильними імуногенами). Саме цим пояснюється велике поширення імунологічних методів, пов'язаних з використанням антитіл, у різних областях біології та медицини. Багато дослідників намагались відшукати способи отримання антитіл з вузькою специфічністю. Однак, у більшості випадків спроби були невдалими, поки у 1975 році Д. Келер і Ц. Мілстейн не запропонували принципово інший метод отримання гомогенних антитіл. Науковці здійснили злиття плазмацитоми (пухлини, що виникла з антитілоутворюючої клітини чи її попередника) з клітинами селезінки імунізованих тварин, отримавши таким чином гібридні клітини (гібридоми), що успадкували від пухлинних клітин здатність необмежено розмножуватися, а від клітин селезінки – синтезувати антитіла зумовленої специфічності. Дана робота дала початок новому етапу з використання антитіл. Внесок Келера та Мілстейна в розвиток науки був гідно оцінений світовою громадськістю, і в 1984 р. їм була присуджена Нобелівська премія [7, 8].

Моноклональні антитіла (МкАТ) високоспецифічні, вони спрямовані проти однієї антигенної детермінанти. Можливе одержання декількох моноклональних

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Шебеда Д. С.			<i>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</i>	Стадія	Арк.
Конс.							13
							135
Керівн.		Дзигун Л. П.				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>	
Затв.							

антитіл на різні антигенні детермінанти, в тому числі складні макромолекули. У силу своєї високої специфічності, стандартності та технологічності, нині, МкАТ виявилися надзвичайно зручним і широко застосовуваним діагностичним засобом, що дозволило значно збільшити специфічність і чутливість тест-систем, заснованих на реакції антиген-антитіло [9].

Передумовами для виникнення методу отримання гібридом, що синтезують моноклональні антитіла, були розробки двох методичних підходів:

- 1) отримання мієлом та супутня адаптація їх до умов культивування поза організмом;
- 2) метод соматичної гібридизації клітин.

Однак, мієломна система як джерело антитіл до більшості антигенів не виправдала надії дослідників. У результаті дослідів, не вдавалося імунізувати тварин таким способом, щоб надалі отримувати мишачі мієломи, що продукують антитіла до імунізуючого антигену. З тисяч мієломних пухлин, індукованих у мишей, лише поодинокі виробляли імуноглобуліни, які реагували з відомими антигенами, що було виявлено шляхом грубого скринінгу потенційних антигенів [7].

Розробки методу соматичної гібридизації клітин проводилася після відкриття феномена спонтанної гібридизації. При злитті плазматичних мембран клітин утворюються клітини з двома або більшою кількістю ядер – гетерокаріони. Після першого поділу клітинні ядра зливаються, у результаті утворюється одне ядро з набором генетичного матеріалу від усіх клітин, що злилися – гібридна клітина. Низьку частоту утворення гібридів можна збільшити, використавши ряд агентів, що порушують цілісність мембран: вірус Сендай, лізолецитин, поліетиленгліколь. Механізми злиття клітин значною мірою залишаються невідомими [7].

Труднощі гібридомної технології:

- Необхідність значних матеріальних ресурсів для організації роботи лабораторії;

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>	А
						14
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

- Жорсткі вимоги до асептичних умов роботи;
- Чутливість та вибагливість гібридом до багатьох факторів та їх низька стабільність;
- Складність розробки адекватних схем імунізації, особливо для слабких імуногенів [10].

Особливості технології:

- Постійна необхідність заморожування та кріозбереження унікальних клонів гібридом;
- Передбачувана перехресна реактивність;
- Низка відмінностей МкАТ та поліклональних антитіл (афінність, здатність до преципітації, фізико-хімічні властивості тощо);
- При одержанні МкАТ немає необхідності жорстких вимог до чистоти антигену [10].

У цілому, використання моноклональних антитіл в експериментальних і клінічних дослідженнях допомагає усунути проблему, пов'язану з неспецифічними реакціями звичайної поліклональної антисироватки, зумовленими присутністю сторонніх антитіл, а також зв'язуванням з антигеном компонентів не імуноглобулінової природи.

Гібридомна технологія інтенсивно розвивається. Прогнозується, що при інтенсивних дослідженнях, у майбутньому буде створена база даних, яка буде містити близько 10^6 типів моноклональних антитіл різної специфічності, синтезованих при злитті клітин щурів, мишей та кролів [11, 12].

1.2. Лінія плазмацитом

Метаболічна селекція гібридів заснована на тому, що нормальні соматичні клітини (В-лімфоцити) можуть використовувати два метаболічних шляхи синтезу нуклеотидів: основний та резервний. За основного шляху, синтез нуклеотидів *de novo* здійснюється внаслідок амінокислотних і вуглеводних

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А 15
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

попередників, а при резервному – з гіпоксантину (пурини) або дезокситимідину (піримідинів). Якщо з якихось причин, основний метаболічний шлях синтезу нуклеотидів блокується, наприклад, додавання до середовища культивування аміноптерину, то нормальні клітини переналаштовуються на резервний шлях синтезу нуклеотидів. У такому випадку, перебіг реакцій забезпечують ферменти гіпоксантин-гуанідин-фосфорибозилтрансфераза (Г/ГФРТ) та тимідинкіназа (ТК) [11].

Якщо в середовище для культивування внести речовину, що блокує основний шлях синтезу нуклеотидів – гіпоксантин, аміноптерин та тимідин (ГАТ середовище), то в такому середовищі мієломні клітини гинуть. Для гібридизації з В-лімфоцитами відбирають тільки мутантні клітини мієломи, у яких не синтезується Г/ГФРТ, оскільки в них наявний тільки основний шлях синтезу нуклеотидів [11].

У системі ГАТ використовують антагоніст фолієвої кислоти аміноптерин. Тетрагідрофолева кислота є коферментом, необхідним для перетворення рибонуклеотиду 5-аміноімідазол-4-карбоксаміду (АІКР) у рибонуклеотид формамідоімідазол-4-карбоксамід (ФАІКР) у біосинтезі пуринів і піримідинів. Аміноптерин, аналог фолієвої кислоти, запобігає утворенню тетрагідрофоліату, що конкурентно пригнічує гідрофоліатредуктазу, і таким чином блокує процеси біосинтезу нуклеотидів (див. Рис. 1.1 та Рис. 1.2). При внесенні в середовище гіпоксантину та тимідину, клітини можуть нормально синтезувати ДНК в умовах, коли основний шлях біосинтезу нуклеотидів блокований аміноптерином. Якщо ферментна система клітини дефектна за цими ферментами, то при взаємодії з аміноптерином вона гине, але здатна вижити, якщо провести злиття з неушкодженою клітиною [7].

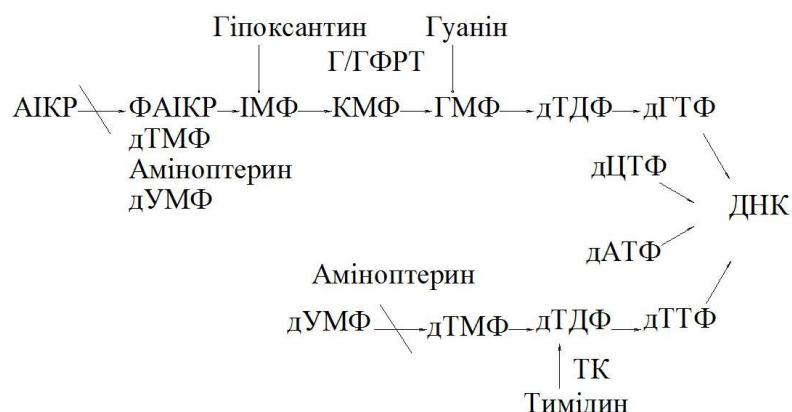


Рисунок 1.1. Схема принципу дії ГАТ системи [1].

АІКР – 5-аміноімідазол-4-карбоксамід; ФАІКР – формамідоімідазол-4-карбоксамід; ІМФ – іюнозин монофосфат; КМФ – ксантин монофосфат; ГМФ – гуанін монофосфат; дУМФ – дезоксиуридин монофосфат; ТДФ – дезокситимідин дифосфат; дГДФ – дезоксигуанін дифосфат; дТДФ – дезокситимідин дифосфат; дГТФ – дезоксигуанін трифосфат; дЦТФ – дезоксицитидин трифосфат; дАТФ – дезоксиаденін трифосфат; дТТФ – дезокситимідин трифосфат.

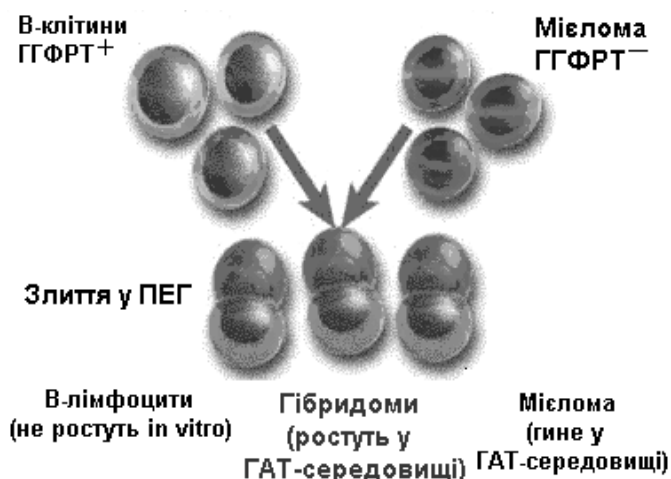


Рисунок 1.2. Селекція гібридом у середовищі ГАТ [10].

Для отримання і відбору мутантних клітин, які не мають ТК або Г/ГФРТ, використовують токсичні аналоги пуринів і піримідинів, наприклад 8-азагуанін

або 6-тіогуанін, які з супутньою дією мутагенних агентів включаються в ДНК. Слід зауважити, що отримання дефектних по Г/ГФРТ клітини у мишей, простий у виконанні процес, оскільки ген цього ферменту розташований на Х-хромосомі, яка в соматичних клітинах ссавців присутня в єдиному числі через інактивацію іншої. У зв'язку з цим, у клітинах експресується тільки одна алель гена Г/ГФРТ, і тому достатньо лише однієї мутації для інактивації ферменту. Отримати мутанти відносно ТК значно важче, через те що, ген ферменту розташований не на статевій хромосомі, тому необхідно наявність одночасно двох однакових мутацій для повного виключення активності цього ферменту [7].

За останні роки, лабораторна база нараховує велику кількість клітинних ліній мієломи, які успішно використовуються для генерації гібридом. Однак не всі культивовані мієломи здатні утворювати стабільні гібридоми, і іноді клонований підряд із раніше підходящої лінії може не задовольняти усі необхідні умови технології.

Таблиця 1.1. Мієломні лінії, що використовуються у гібридомній технології [10].

Назва лінії	Джерело	Фенотип
Лінії миші		
Sp 2/0-Ag-14	МОРС-21 × Balb/c	не синтезує Ig
X63-Ag8.653	— ” —	— ” —
MPC-11	Balb/c	— ” —
S-194	— ” —	— ” —
P3-NS1-Ag4-1	МОРС-21	синтезує к ланцюги
Лінії щурів		
Y3-Ag1.2.3	Lou/c	синтезує к ланцюги
IR983F	— ” —	не синтезує Ig
YB2/0	Lou/c × АО	— ” —
Лінії людської мієломи		
RPMI-8226	лінії лімфоцитів, трансформовані ВЕБ	низький рівень синтезу Ig
H My-2	— ” —	— ” —
IM 9	— ” —	— ” —
GM-1500	— ” —	— ” —
U-622	пацієнт з IgE глобулінемією	синтезує IgE

Основними поживними середовищами, що використовують при отриманні гібридом, є середовища RPMI 1640 та ІГЛА в модифікації Дульбекко (DMEM), які застосовують окремо або в комбінації, попередньо провівши процес залуження в універсальних контейнерах, шляхом рівноважної взаємодії продуктів з атмосферним повітрям. Основними відмінностями середовищ є те, що RPMI-1640 не має пірувату, а в DMEM не має аспарагіну. Жоден із цих інгредієнтів не є необхідним для гібридом. [7].

Лінії плазмацитом зазвичай культивують в концентрованому середовищі RPMI-1640 з додаванням L-глутаміну; 10% ембріональної телячої сироватки; антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину, зрідка додають тіогуанін для видалення ревертантних клітин, що містять певний рівень Г/ГФРТ, які, подібно до гібридних клітин, виживають у середовищі ГАТ [11].

ГАТ середовище. Середовище складається з концентрованого стандартного середовища RPMI-1640 з додаванням L-глутаміну та 20% розчину ембріональної телячої сироватки (ЕТС) [11]. Однак, у порівнянні з чистим поживним середовищем RPM-1640, селекція на середовищі ГАТ триває вдвічі довше, оскільки вона містить нуклеотиди, які уповільнюють засвоєння азасерину або аміноптерину. Середовище слід зберігати відповідно до інструкцій, через те, що глутамін термолабільний і його розпад супроводжується виділенням токсичного аміаку, а аміноптерин чутливий до світла та не стійкий при тривалих заморожуваннях [13].

Необхідним компонентом поживного середовища є *ембріональна теляча сироватка* (ЕТС), попередньо температурно інактивована. Різні партії ЕТС варіюють за здатністю підтримувати ріст культури, тому надзвичайно важливо відібрати для дослідів якісний зразок. Якщо ЕТС не високої якості, дозволяється додаткове введення в середовище кінської сироватки (до 5%). Для отримання чистих моноклональних антитіл все більшого застосування набувають безсироваткові поживні середовища, оскільки різноманітний склад сироваток

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		19

призводить до труднощів очищення МкАТ, а для великомасштабних виробництв ЕТС є коштовною сировиною [11].

Техніка отримання гібридом являє собою вирощування клітинного потомства з однієї клітини, висіяні за дуже низької щільності, дотримуючись такої умови, ріст клітин сильно сповільнюється і в значній мірі визначається наявністю у поживному середовищі достатньої кількості поживних речовин і стимулюючих факторів. У зв'язку з цим, при отриманні гібридом часто використовують *клітини живильного шару*. Ефект проявляється тим сильніше, чим менш оптимальним є середовище культивування. При використанні деяких партій сироваток і сильно збагачених середовищ, ефект клітин живильного шару часто не виявляється. Як клітин живильного шару використовують клітини селезінки, тимоцити, перитонеальні макрофаги, мишачі фібробласти. Здебільшого, у якості клітин живильного шару використовують перитонеальні макрофаги. Бажано використовувати сингенні макрофаги, тому що, у алогенних і ксеногенних макрофагів величина стимулюючого ефекту, зазвичай, нижча. Клітини живильного шару можна додавати або разом з сумішшю мієломних і селезінкових клітин, оброблених поліетиленгліколем, або за добу до злиття, чи через добу після нього [7, 11].

Проте, використання клітин живильного шару має певний ряд недоліків: приготування є занадто трудомістким та довготривалим; у більшості випадків, живильний шар є потенційним джерелом бактеріальної контамінації, а при недотриманні культуральних умов, такі клітини можуть переростати та пригнічувати ріст гібридом, перешкоджаючи візуальній ідентифікації колоній гібридом [7].

Всіх цих недоліків позбавлені кондиційовані середовища, що являють собою супернатант культур, у яких росли клітини живильного шару. Для отримання гібридом використовуються середовища, кондиційовані епітелієм людини, клітинами ендотелію, перитонеальними макрофагами та мишачими фібробластами [11].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		20

1.3 Вибір експериментальної тварини

Лабораторні тварини є важливою частиною технології отримання субстанції антитіл. Організації та компанії зобов'язані проводити політику та процедури для забезпечення належних умов утримання та гуманного поводження з тваринами. Будь-яке утримання тварин керується нормативною документацією та відповідними протоколами. Не дотримання зазначених правил безпечного поводження з тваринами та будь-якими біологічними відходами, карається регулювальним органом та законом [13].

Вибір експериментальної тварини визначається за наявністю батьківських мієломних ліній, можливістю отримання гібридів клітин цих ліній та імунних лімфоцитів, а також здатністю до розмноження отриманих гібридів в організмі тварини. Зазвичай, для імунізації використовують мишей і щурів. Це пов'язано з тим, що відповідні мієломні клітини мишей та щурів широко поширені і, крім цього, при вирощуванні отриманих гібридом в організмі цих тварин не виникає складнощів. Сила імунної відповіді у різних ліній мишей може відрізнятися, тому інколи, при проведенні експерименту виникають випадки заміни лінії тварин на іншу чи на гібридну лінію F1. З-поміж різних субтипів мишей, найбільш затребуваною є інбредна лінія мишей Balb/c. Завдяки низькій частоті виникнення спонтанних пухлин, тварини здебільшого використовують для довготривалих експериментів, а в порівнянні з іншими лініями мишей, зокрема, C57BL/6, лінія Balb/c характеризується збільшеним розміром селезінки та підвищеною лімфоцитарною відповіддю. Самки цієї лінії служать одним з батьківських партнерів для розмноження гібридів F1. За серологічними дослідженнями, співвідношення між класами імуноглобулінів, виявлені у мієломі Balb/c становить 30-50% IgA, 30% IgG і 3% IgM [7, 14].

Імунізація щурів проводиться у тих випадках, коли потрібно отримати антитіла до антигенів миші, для яких відсутній поліморфізм серед різних ліній мишей. Отримані гібридомні клітини можна вирощувати в організмі щурів, або в організмі мишей після послаблення їх імунологічної реактивності. Для імунізації

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А 21
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

щурів рекомендовано використовувати лінію LOU/C, але цілком задовільні результати виходять з більш доступними в нашій країні щурами лінії Wistar [7].

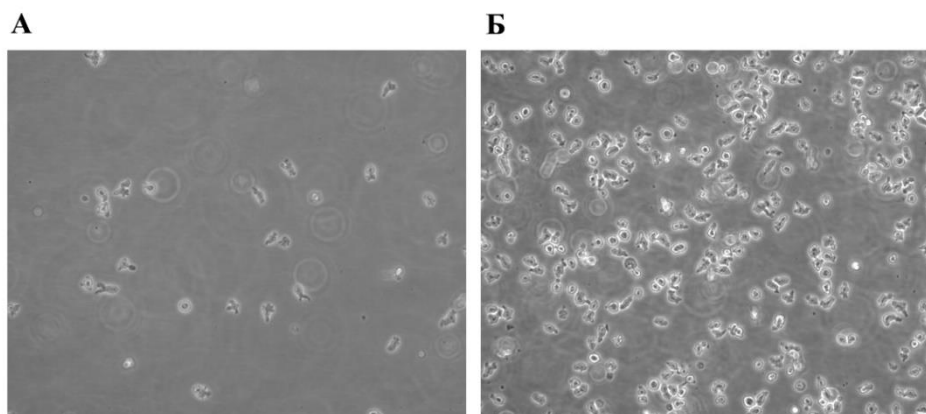


Рисунок 1.3. Мікрофотографії гібридомних клітин. А – невелика щільність; Б – висока щільність. Клітини мають правильну округлу форму, поодинокі або утворюють кластери [15].

Терапевтичне застосування моноклональних антитіл, отриманих при імунізації мишей має певні обмеження. Введення їх в організм людини часто супроводжується посиленою імунною відповіддю на гетерогенний мишачий білок. Це призводить до швидкого усунення бажаного терапевтичного ефекту з ускладненнями, у вигляді ураження нирок і гіперчутливості до чужорідного білка. Для усунення небажаних наслідків та підвищення спорідненості до антитіл, були розроблені методи заміни продуцента серед лабораторних тварин або часткової видозміни імунологічної структури вже синтезованих антитіл.

З-поміж дослідних тварин, отримати стабільні гібридні клітини вдалось лише при роботі з лімфоцитами кролів і мієломою миші та з клітинами яєчника китайського хом'ячка, так званими СНО-клітинами [14].

Один із новітніх напрямків терапевтичного застосування моноклональних є культивування *in vivo*. Для цієї мети, очевидно, більш необхідним є впровадження моноклональних антитіл людини, що може стати корисним при транспортуванні радіоізотопів до пухлин для діагностичної візуалізації або їх елімінації. Однак, отримання клітин плазмацитоми людини для експериментів по

гібридизації поки має теоретично обґрунтований зміст та малоефективні дослідницькі зразки з низькою імуногенністю. Клони людських В-лімфоцитів досить важко підтримуються в культурі в лабораторних умовах. У ході складних генно-інженерних методів, були отримані альтернативні людським МкАТ, які є поєднанням клітин миші з клітинами людини у різних співвідношеннях. Таким способом було створені химерні та гуманізовані (гіперхимерні) антитіла, однак їх імуногенність на порядок нижча, порівнянюючи з вихідними мишачими антитілами (див. Рис. 1.4) [11, 14].

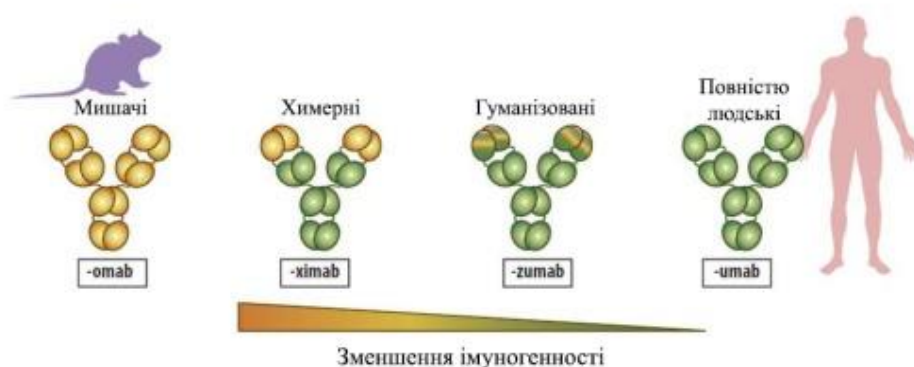


Рисунок 1.4. Типи моноклональних антитіл і їх номенклатура. Закінчення назв препаратів моноклональних антитіл різних типів вказані в рамках [8].

Користуючись технікою рекомбінантної ДНК, вчені штучно змінили метаболічні шляхи синтезу антитіл миші з продукуванням людського Fc-фрагменту. Здебільшого, антигени, що провокують процеси відторгнення чужорідних антитіл знаходяться саме в Fc-фрагментах. Отримані таким способом химерні антитіла містять 30-35% мишачого і 65-70% людського білка, а в гуманізованому антитілі вміст людського білка досягає 90-95%. У результаті, частота утворення нейтралізуючих антитіл у відповідь на введення модернізованих антитіл зменшується у разі мишачих з 74% до 46% при застосуванні химерних і 0-4% – гуманізованих антитіл. Штучно видозмінені антитіла знайшли застосування при лікуванні, переважно, онкологічних та імунних захворювань [16].

За останні 15 років було затверджено близько 30 терапевтичних моноклональних антитіл. Більшість з них молекули IgG₁ та IgG_{2a}. Причини успіху застосування цього класу імуноглобулінів обумовлені тим, що вони володіють тривалим часом напівжиття у сироватці, а також ефекторними функціями їх Fc регіонів [17].

Для отримання повністю чистих людських антитіл, впроваджується метод фагового дисплея, суть якого полягає у вбудовуванні гену, який кодує необхідний білок (у тому числі необхідні антитіла), у генотип бактеріофага, внаслідок чого він починає відтворювати цей білок на своєму капсиді, що дає можливість пізніше отримувати цей білок у необхідних кількостях методом білкової інженерії [17, 18].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		24

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

Генетично чужорідні речовини, потрапляючи в організми людини та вищих тварин, здатні викликати ряд специфічних процесів, направлених на їх елімінацію з організму. До антигенів відносяться білки, полісахариди, нуклеїнові кислоти як в очищеному вигляді, так і у вигляді компонентів різних біологічних структур (клітин, тканин, вірусів і т.д.) Одним із найважливіших з процесів імунної системи, слід вважати утворення специфічних білків крові – антитіл (імуноглобулінів). Біологічна функція який, полягає у захисті організму від чужорідних речовин шляхом утворення міцних імунних комплексів з відповідними антигенами та подальшим видалення їх з організму. Здатність антитіл утворювати високоспецифічні міцні комплекси з різноманітними речовинами та можливість отримання антитіл у необхідних кількостях є основою імунохімічних методів аналізу [19].

Імуноглобуліни за своєю хімічною структурою належать до великого класу природних сполук – глікопротеїнів, білків, що містить у своїй структурі олігосахариди (2-3%). Попри на величезну різноманітність антитіл і їх гетерогенність, усі вони володіють загальними структурними елементами, що забезпечують виконання їх основних функцій. За своїми антигенними, ефекторними властивостями та структурними особливостями, імуноглобуліни поділяються на п'ять основних класів: IgA, IgD, IgE, IgM та IgG. Загальною структурною одиницею всіх імуноглобулінів є комплекс з чотирьох поліпептидних ланцюгів – двох ідентичних між собою легких (L) ланцюгів з молекулярною масою 25 кД кожен і важких (H) з молекулярною масою по 50-70 кД. Два кінці важких ланцюгів утворюють константну частину, яка буває декількох типів. Антитіла з однаковою константною частиною складають один ізотип або клас. До складу кожного легкого ланцюга входить два домени – один варіабельний (VL) і один константний (CL), а до складу кожного важкого – один

					ДП 6123.00.000 ПЗ				
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		Стадія	Арк.	Аркушів
Розроб.		Шебеда Д. С.						25	134
Конс.							КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Дзигун Л. П.							
Затв.									

варіабельний (VH) і три константних (CH-3). Кожен з доменів в основному являють собою β -складчасту структуру, сформовану з 7 антипаралельних β -складок, що утворюють два β -листи. Легкі ланцюги міцно з'єднані з NH₂-кінцевими ділянками важких ланцюгів, завдяки наявності міжланцюгових дисульфідних зв'язків і інших міжатомних взаємодій. Аналогічні зв'язки існують і між вільними ділянками важких ланцюгів. У цілому, структура такого комплексу нагадує латинську букву Y і характерна для імуноглобулінів класів IgG, IgD, та IgE (див. Рис. 2.1). Структура імуноглобулінів різних класів обумовлена числом і розташуванням дисульфідних зв'язків у молекулах, а також кількістю чотирьохланцюгових елементів [20, 21].

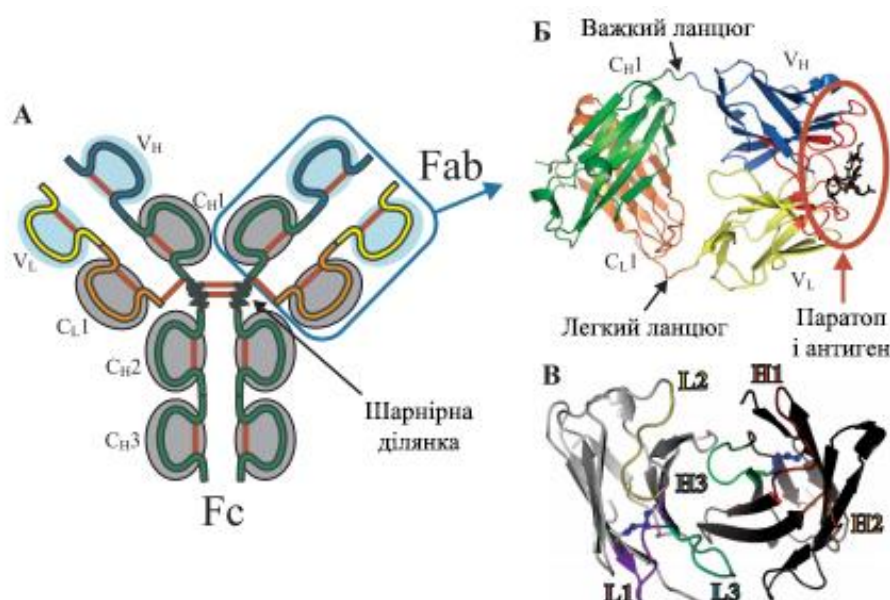


Рисунок 2.1. А – загальна схема будови IgG; Б – взаємодія антигену і Fab-фрагмента антитіла; В – будова антиген-зв'язуючої ділянки [22].

Більшість захворювань людини супроводжується змінами вмісту антитіл в організмі. Гуморальна імунна відповідь хворого може характеризуватися підвищенням або зниженням концентрації у крові як різних класів, так і підкласів імуноглобулінів. Кількісне визначення підкласів IgG може бути використано як діагностичний інструмент для багатьох захворювань, точного виявлення їх стадії, прогнозу розвитку захворювання, а також для контролю проведеного курсу лікування [22]. Штам продуцент, що використовується у

досліджуваний технології виробництва субстанції моноклональних антитіл продукує цільовий продукт з ізотопом до IgG, тому розглянемо більш детально біохімічні особливості саме цього класу імуноглобуліну.

2.1. Біохімічна структура імуноглобуліну класу G

При гідролізі протеолітичним ферментом папаїном, молекула IgG розпадається на три фрагменти, два з яких ідентичні та зберігають здатність зв'язувати антигени (Fab-фрагменти) і третій, здатний до кристалізації (Fc-фрагмент), що відповідає за ефektorну функцію антитіл.

У сироватці крові людини виділяють чотири підкласи імуноглобуліну, з відносною концентрацією: IgG_1 (70%) > IgG_2 (20%) > IgG_3 (6%) > IgG_4 (4%), відмінності яких, пов'язані з не спіралізованими ділянками двох ідентичних важких ланцюгів, що гнучко зв'язують Fc-фрагмент з двома Fab-фрагментами (шарнірна ділянка) [21].

При інфекційних захворюваннях, зазвичай, спостерігається підвищення рівня сироваткових IgG, обумовлене ініціацією біосинтезу антитіл до антигенів збудника інфекції. Концентрація специфічних антитіл та співвідношення в них підкласів IgG залежать від будови та властивостей антигену, дози та тривалості його впливу на імунну систему, а також імунного статусу людини.

За результатами серологічних реакцій, у крові людей, що перехворіли на гострий гепатит В, переважають антитіла до HBs-антигену вірусу, що відносяться до IgG_1 та IgG_3 , а анти-HBs-антитіла належать до IgG_2 і IgG_4 , виявляються лише в незначних кількостях [22].

2.2. Фізико-хімічні закономірності взаємодії антиген-антитіло

Антитіла, що утворюються у відповідь на введення в організм антигенів, здатні специфічно з ними взаємодіяти. В основі первинної взаємодії лежать загальні принципи будь-якої біомолекулярної реакції, продуктом реакції якої є комплекс антиген-антитіло. Імунна реакція є оборотною і описується тими ж

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		27

кінетичними та термодинамічними параметрами, що і будь-який процес комплексоутворення.



Ступінь відповідності між антигенною детермінантою та антигензв'язуючою ділянкою активного центру антитіла (імунологічна специфічність) визначається хімічною та просторовою компліментарністю, яка обумовлена, з одного боку, взаємодією електронних хмар реагуючих хімічних груп, з іншого – стеричними силами відштовхування. З кількісного боку, специфічність взаємодії антиген-антитіло характеризується через афінність антитіла або рівноважну константу утворення імунокомплексу (K_a , л/моль) або його розпаду ($K_d = 1/K_a$, моль/л).

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\text{Ab} - \text{Ag}]}{[\text{Ab}][\text{Ag}]}. \quad (2.2)$$

Максимальні значення констант зв'язування характерні для антигенів, які мають яскраво виражені гідрофобні властивості або ж взаємодіють з активним центром антитіла великою областю молекули. Оскільки молекула антитіла має два і більше антигензв'язуючих центрів, і крім того, здатна взаємодіяти з декількома антигенними детермінантами молекули антигену, реальний процес взаємодії полівалентного антитіла з полівалентним антигеном є більш складним і характеризується функціональною афінністю або авідністю. З кількісної точки зору, бівалентні взаємодії є майже на три порядки більше міцними, ніж моновалентні [23, 24].

Складність визначення афінності (константи зв'язування антитіла) обумовлені наступними причинами: гетерогенність антитіла за фізико-хімічними властивостями, в тому числі, спорідненості до антигену; складністю визначення загальної кількості специфічних антитіл; можливістю утворення комплексів складного складу в разі полівалентних антигенів. Однак для практичних цілей,

зокрема для використання в імуноферментному аналізі, досить знати ефективні значення, що характеризують сумарні властивості використовуваних антитіл. Для моноклональних антитіл значення константи афінності є необхідним [24].

2.3. Якісні реакції взаємодії антиген-антитіло

Усі методи, що дозволяють визначати концентрації вільного та зв'язаного антигену, можна умовно розбити на дві великі групи. До першої відносяться методи, в яких стадія поділу вільного і зв'язаного антигену здійснюється шляхом вибіркового осадження, афінного зв'язування (іммобілізації) або гелі-фільтрації. Для низькомолекулярних антигенів (гаптенів) використовується рівноважний діаліз. Друга група включає методи, що базуються на зміні фізико-хімічних властивостей антигенів (або міток, пов'язаних з антигеном) при комплексоутворенні з антитілами: гасінні або посиленні флуоресценції, зміні ступеня флуоресценції, інгібуванні ферментативної активності.

Взаємодія антигену з антитілами може призводити до різних наслідків, включаючи преципітацію (якщо антиген розчинний), аглютинацію (якщо антиген являє собою тверду частинку) й активацію комплементу. Всі ці результати обумовлені взаємодією між полівалентними антигенами й антитілами, які мають принаймні дві ділянки для зв'язування молекули антигену. Перераховані реакції, що розвиваються при взаємодії антиген-антитіло, не є характерними при первинній імунній відповіді на відповідні антигенні епітопи, а більшою мірою зображують повторні взаємодії полівалентних антигенів з антитілами [22, 23].

2.4. Методи очищення антитіл

Антитіла секретуються клітинами-продуцентами в оточуюче середовище, і для отримання чистого препарату необхідний багатоступеневий процес відділення антитіла від усіх домішок. Більшість напрямків застосування антитіл, не потребує їх очищення, тому вони використовуються у вигляді культуральних або асцитних рідин. Грубу імуноглобулінову фракцію можна отримати шляхом

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А 29
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

висолювання білків 45% розчином сульфату амонію, з наступною процедурою діалізу. Якщо антитіла необхідно виділити в чистому вигляді, то попередньо визначають їх клас і підклас, оскільки способи очищення розрізняються для антитіл різної структури. Здійснити ідентифікацію можна за допомогою методу імунодифузії за Ухтерлоні, використовуючи набір антисироваток, специфічних до різних антитіл. Процес відділення антитіла від усіх непотрібних і потенційно небезпечних домішок включає різні види хроматографії, діалізації й інактивації вірусів. Виділення чистих антитіл найкраще проводити на імуносорбентах, що являють собою ковалентно зв'язаний антиген з будь-яким носієм, наприклад сефарозою. Фіксовані клітини, також можна вважати імуносорбентом, їх застосовують для виділення антитіл до антигенів клітинної поверхні. Впровадження такого способу є не досить точним, адже існує висока ймовірність зміни антигенної структури при фіксації [25, 26].

Якщо не вдається виділити антитіла прямим способом, то їх отримують за допомогою різних методів афінної та іонообмінної хроматографії. Найбільш лабораторно простим методом є хроматографії на сефарозі з ковалентно зв'язаним білком А. Такий білок синтезують бактерії *Staphylococcus aureus*, який має високу спорідненість до Fc-фрагментів антитіл. З розвитком методів хроматографії, було запропоновані інші білки бактеріального походження: білок-G, синтезований стрептококами та білок-L від *Peptostreptococcus magnus*. Вони характеризуються ширшим спектром зв'язування з імуноглобулінами, в тому числі взаємодії з імуноглобулінами тварин, які майже не утворюють комплекси з білком А (див. Табл. 2.1) [25, 27].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		30

Таблиця 2.1. Взаємодія різних серотипів Ig тварин відносно білків А, G та L [27].

Види	Клас Ig	Білок А	Білок G	Білок L
Миша	Total IgG	++++	++++	++++
	IgG1	+	++++	++++
	IgG2a	++++	++++	++++
	IgG2b	+++	+++	++++
	IgG3	++	+++	++++
Людина	Total IgG	++++	++++	++++
	IgG1	++++	++++	++++
	IgG2	++++	++++	++++
	IgG3	+	++++	++++
	IgG4	++++	++++	++++
	IgA	–	–	++++
	IgD	–	–	++++
	IgE	–	–	++++
	IgM	–	–	++++
	κ	–	–	++++
	λ	–	–	–
	Fab	++	++	++++
	sFv	++	–	++++
Щур	Total IgG	+	+	++++
	IgG1	–	+	++++
	IgG2a	–	++++	++++
	IgG2b	–	++	++++
	IgG2c	+	++	++++
Кріль	Total IgG	++++	+++	+
Віслюк	Total IgG	++	++++	–
Вівця	Total IgG	+	++	–
	IgG1	+	++	–
	IgG2	+++	+++	–
Коза	Total IgG	+	++	–
	IgG1	+	+++	–
	IgG2	+++	+++	–
Корова	Total IgG	++	++++	–
	IgG1	+	+++	–
	IgG2	+++	+++	–
Курка	Total IgG	–	+	++

Кінцевою стадією виробництва антитіл є суспендування в фосфатно-сольовому буфері. Ізотонічний буфер виконує роль розчинника, завдяки чому досягається необхідна концентрація продукту, підтримується сталий рівень рН та запобігається можлива міжклітинна адгезія. Тривале збереження розчину імуноглобулінів передбачає замороження до низьких температур або кріоконсервування у рідкому азоті. Для уникнення факторів ушкодження (утворення внутрішньоклітинного льоду, зневоднення) біологічних структур до розчину антитіл додають кріопротектори. Найбільш поширеним консервантом є натрій азид – добре розчинна газоутворююча сіль, яка володіє вираженими антибактеріальними властивостями, не летка та є економічно вигідною, у порівнянні з іншими речовинами. Головним недоліком застосування натрію азиду є висока токсичність, тому консервант додають у надмалих кількостях з концентрацією 0,1%.

2.5. Напрямки застосування антитіл

Антитіла широко використовуються як в наукових дослідженнях, так і в практичній медицині завдяки їхній здатності з високою афінністю і специфічністю упізнавати практично будь-який антиген. Найпростіший спосіб отримання антитіл, специфічних до якого-небудь антигену, це імунізація – введення антигену в суміші з певними добавками (ад'ювантами), що підсилюють імунну відповідь, в організм тварини (миша, кролик, коза, вівця). З крові імунізованих тварин можна виділити поліклональні антитіла – гетерогенну за будовою, епітопною специфічністю й афінністю популяцію антитіл, специфічних до введеного антигену. Ефективність препаратів антитіл, отриманих при імунізації тварин, змінюється від однієї партії до іншої, оскільки в одних випадках під час проведення імунізації антитілопродукуючі клітини сильніше стимулюються одними детермінантами певного антигену, а в інших імунна система активніше відповідає на інші епітопи того самого антигену. Це може впливати на здатність різних препаратів антитіл сполучатися з антигенами, оскільки окремі епітопи мають різну ефективність (стимулюючу здатність). Тому в одній партії поліклональних антитіл може міститися незначна кількість молекул, спрямованих проти основного епітопа, і в результаті вона буде мало ефективною. Щоб підвищити специфічність антитіл, для діагностики часто використовують моноклональні антитіла. Головною перевагою яких є отримання їх у необмеженій кількості при незмінних від партії до партії характеристик, завдяки чому, існує можливість створення стандартних діагностичних наборів реагентів для визначення різних речовин [22, 28].

Біоспецифічні антитіла є одним із найбільш поширених інструментів сучасної біохімії, цитології та клінічної хімії. З їх допомогою можна проводити якісне та кількісне визначення вмісту різних речовин методами імуноферментного аналізу та імуноблотингу, вивчати внутрішньоклітинну та позаклітинну локалізацію білків, досліджувати розподіл і рівень експресії біологічних структур у різних клітинах організму методами імуногістохімії й

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А 32
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

імуноцитохімії, зв'язуючи їх з флуоресцентними маркерами. Методику ChIP-sequeпсcіng (імунопреципітація хроматину) проводять з метою з'ясування, з якими послідовностями ДНК в клітині зв'язуються досліджувані білки, наприклад, гістони, відокремлюючи фрагменти ДНК. Все більшого застосування в онкологічній практиці набувають препарати на основі антитіл кон'югованих з токсичними речовинами, що залучаються в таргетній терапії. Протипухлинний механізм включає накопичення специфічних антитіл до білка ракової пухлини в тканинах, тим самим транспортуючи інгібіторні речовини.

Антитіла широко використовуються в лікуванні захворювань, патогенез яких, пов'язаний з імунними процесами. З їх допомогою лікують псоріаз, аутоімунні захворювання, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, виділяючи декілька типів механізму дії:

- Зміна клітинних сигналів. Антитіла блокують рецептори на поверхні клітин, уникаючи взаємодію рецептора з відповідним лігандом та зупиняючи каскад супутніх реакцій.
- Комплемент-залежна цитотоксичність. Антитіло зв'язується з поверхневим антигеном злоякісної клітини, що призводить до активації багатоетапної системи комплементу (механізму імунної відповіді). Кінцевим етапом реакцій є утворення особливого білка, який перфорує клітинну мембрану ракової клітини, що призводить до її загибелі.
- Розвиток адаптивного імунітету. У більшості випадків, утворення та розвиток злоякісних пухлин пов'язане з послабленою здатністю імунітету розпізнавати чужорідні клітини та самостійно елімінувати їх. Препарати антитіл стимулюють імунну відповідь, як наслідок знешкоджуючи патоген [29].

Терапевтичне застосування антитіл, одержуваних з сироватки імунізованих тварин або з використанням гібридомних технологій, істотно ускладнюється тим, що константні домени антитіл тварин є сильно імуногенними для людини, що призводить до утворення власних антитіл, специфічних до антитіл тварини. Тому для терапевтичних цілей, як правило, використовують рекомбінантні

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		33

антитіла або їх фрагменти, отримані з моноклональних, з істотно зниженою, внаслідок генно-інженерних маніпуляцій, імуногенністю, або отримані структури *de novo* з використанням різних дисплейних методів [22].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		34

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

В імунній системі немає клітинних структур, які б продукували антитіла з заданими властивостями та здійснювали реакції імунітету. Антитіла утворюються лише в ході імуногенезу. При проведенні імунохімічних досліджень, використовують здатність антитіл специфічно взаємодіяти з певними антигенами за принципом «антиген-антитіло». Для проведення такого аналізу необхідні ідентичні антигени, синтез яких звичайним способом не доступний. Тому, особливо важливим є повна деталізація біохімічних особливостей антигену та його детермінантів, механізму взаємодії, а також принципу імунної відповіді, для штучного відтворення.

Цільовим продуктом технології біосинтезу антитіл, наведеному в дипломному проєкті, є антитіла специфічні до вірусу гепатиту В, які є основою вірусної діагностики. Детальна структура вірусу ГВ та його антигену наведена в пункті 3.1.

3.1. Структура антигену до якого специфічні цільові МкАТ

Збудник ВГВ належить до родини *Hepadnaviridae*. Це невеликий за розміром, до 42 нм, віріон, який складається з зовнішньої ліпідно-білкової оболонки та нуклеокапсиду у формі ікосаедра з білковими компонентами. Зовнішня оболонка утворена, вбудованими у мембрану, білками, які беруть участь в прикріпленні та проникненні вірусу у клітини органів. Нуклеокапсид містить вірусну ДНК, ковалентно зв'язану з поліпептидом, протеїнкіназу та ДНК-полімеразу яка має зворотну транскриптазу подібно до ретровірусів. ДНК-полімераза бере участь у реплікації ДНК у разі проникнення віріону до ядра гепатоцита. Будова віріона представлена на Рис. 3.1 [30, 31].

					ДП 6123.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шебеда Д. С.			РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Арк.	Аркушів
Конс.							35	135
						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Дзигун Л. П.						
Затв.								

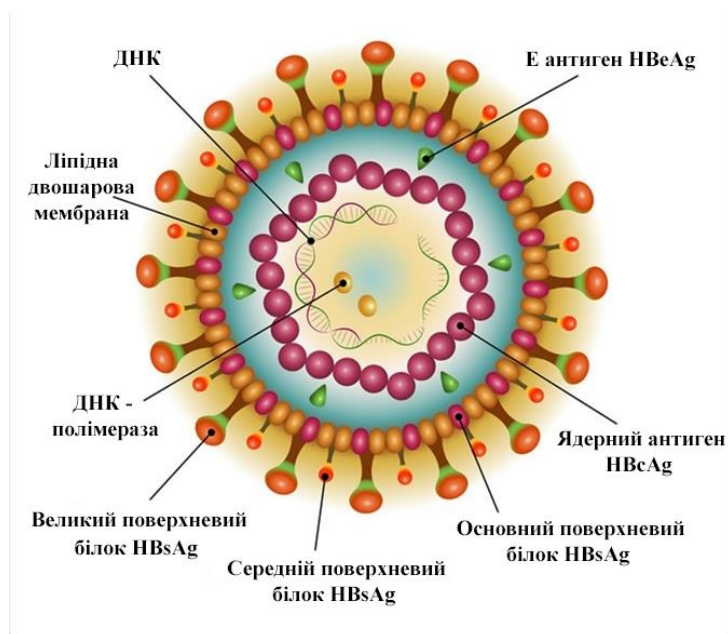


Рисунок 3.1. Будова віріона вірусу гепатиту В [32].

Генетичний апарат вірусу представлений частково дволанцюговою кільцевою молекулою ДНК, що складається приблизно з 3020-3320 нуклеотидів. Складовими частинами ДНК є «зовнішній мінус-ланцюг», який довший, орієнтовно, на 15-45% від неповного «внутрішнього плюс-ланцюга». ДНК-полімераза, у процесі репродукції вірусу, заповнює пробіл «плюс-ланцюга», роблячи двониткову структуру ланцюга повною. ДНК збудника містить 4 складових елементів геному, які позначають латинськими літерами P, S, C і X. Відкриті рамки зчитування певних генів частково перекривають один одного, що забезпечує високу інформаційну місткість геному вірусу [33].

Зовні нуклеокапсид оточений поверхневим антигеном HBsAg (англ. Hepatitis B surface Antigen) – основним маркером інфікування, який є структурним білком, що відповідає за адсорбцію вірусу на клітинах гепатоцитів. При інфекційному процесі, він виявляється ще в інкубаційний період до появи клінічних симптомів та міститься в практично всіх біологічних рідинах – крові, сироватці, секретах з концентрацією від декількох пікограм до сотень мікрограмів, іноді вміст наближається до концентрації нормальних сироваткових білків. Антиген може утворювати три типи структур: сферичні (L), тубулярні (M) та великі сферичні (S), залежно від складу до якого входять білки, ліпіди та

вуглеводи (див. Рис. 3.2). Сферичні структури є основним компонентом оболонки та визначають взаємодію віріона з гепатоцитом і, як показано в останній час, безпосередньо з білком анексином V. За відсутності інших оболонкових білків, структура полімеризується та утворює сферичні частинки діаметром 20 нм, які складаються з 100 поліпептидних молекул. Тубулярні – беруть участь у морфогенезі віріонів при виході їх з клітини, а великі сферичні структури забезпечують розпізнавання субстрату до якого прикріплюється віріон. За останніми даними, L-, M- і S-білки представлені в зовнішній оболонці віріона в співвідношенні 1: 1: 4 [34]. Встановлено, що до складу антигену входить 7-9 поліпептидів (P1-P9); вуглеводи (3,6-7,5% від маси) як стабілізатор імуноактивності та ліпіди (20-30% від маси). Середня молекулярна маса частинок антигену складає від 3,7 до 4,6 кД, константа седиментації коливається в межах 39S - 54S, ізоелектричні точки варіюють 3,9 - 5,6 рН. Хоча хімічна будова антигену до кінця не вивчена, проте є припущення, що вуглеводи та ліпіди, антиген HBsAg отримує з плазмолемі під час виходу з інфікованої клітини. У геномі віріону антиген кодується геном S [6, 35].

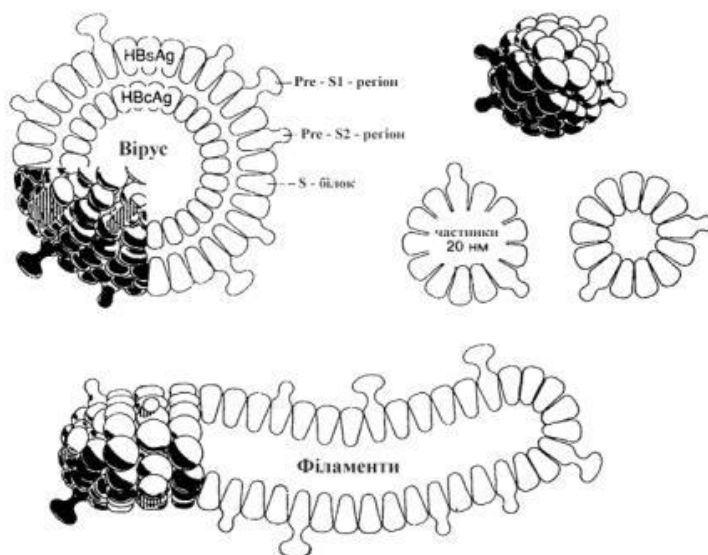


Рисунок 3.2. Білкові структури поверхневого антигену HBsAg [36].

Ген S містить інформацію про склад головного ліпопротеїду зовнішньої оболонки вірусу гепатиту В – HbsAg. Йому передують ще дві зони: *pre-S₁* і

pre-S₂. Всі зони кодують білкові структури: сферичну (ген S), тубулярну (ген S і *preS₂*) і велику сферичну (ген S, *pre-S₂*, *pre-S₁*). Білкові-структури мають різні місця ініціації, проте термінація має спільну ділянку.

Зона *pre-S₁* відповідає за певний білок, що легко прикріплюється до рецептора IgA на поверхні гепатоцита. Завдяки чому, вірус гепатиту В проникає в печінкову клітину. Зона *pre-S₂* несе інформацію про ділянку зв'язування збудника, з так званим, полімеризованим альбуміновим рецептором, який теж присутній на гепатоциті. Ген S експресується на дуже високому рівні тільки в клітинах печінки та під впливом стероїдних гормонів. Це пояснює той факт, що ризик розвитку хронічного гепатиту більший у чоловіків, а ніж у жінок, у яких рівень стероїдних гормонів нижчий [37].

За морфологічними, біохімічними, фізико-хімічними та імунологічними властивостями HBsAg неоднорідний. Серологічно виділяють десять субтипів маркеру, загальних по *a*- і різних по *d*-, *y*-, *r*- і *w*- детермінантам: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adr*, *adrq+*, *adrq-*. Розмежовують й інші субтипові детермінанти *g*-, *x*-, *f*-, які, однак, не розрізняються морфологічно та створюють перехресний імунітет під час зараження. Поєднання антигенних детермінант HBsAg визначає його субтипи. Вивчення субтипів має значення, в основному, для епідеміологів, оскільки частота виявлення їх у різних регіонах неоднакова, тому вони являють собою епідеміологічні регіональні мітки. Частота виявлення HBsAg субтипу *ay* в Україні становить 65-98% [38, 39].

Вірус ГВ володіє мутаційною мінливістю, з чим можуть бути пов'язані деякі випадки ациклічного перебігу захворювання. Так, крім нормального «дикого» варіанту, існують мутантні форми. Мутації в *S*-гені призводять до зміни антигенної структури *a*-детермінанти, яка являє собою імунодомінантну область HBsAg. Реагенти, які використовуються у багатьох діагностичних аналізах, спрямовані проти епітопів даної детермінанти для вірус-нейтралізуючих антитіл. Мутації, у більшості випадків, спричинені заміною в складі антигену стандартної амінокислоти в певному положенні на будь-яку іншу, зокрема гліцину на аргінін. Цього достатньо аби мутантний штам не вловлювався циркулюючими

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		38

антитілами, що має особливо важливе значення під час проведення вакцинації. Зараз у багатьох країнах світу *S*-мутантні штами виявляють навіть частіше, ніж дикі штами, що може бути причиною неефективної вакцинації або діагностики.

Мутантні *pre-S*-штами мають набагато нижчу здатність до синтезу HBsAg, тому в інфікованих ними осіб спостерігається низька концентрація поверхневого антигену, яку не можна встановити лабораторними методами [39].

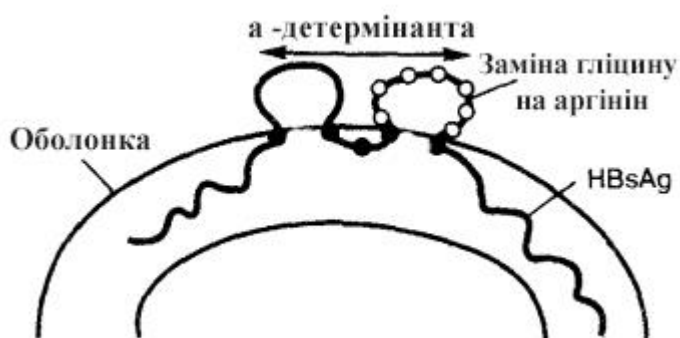


Рисунок 3.3. Мутована *a* детермінантна HBsAg [36].

З-поміж інших структур віріону, поверхневий антиген є високо стійким до дії фізико-хімічних факторів. Він не руйнується під час багаторазової термічної обробки – заморожування та розморожування, довго зберігається у висушеному стані. Температурна обробка при $t=60^{\circ}\text{C}$ протягом 21 год не призводить до руйнування, частково втрачається активність антигену тільки після 30-хвилинного прогрівання при температурі $t=98^{\circ}\text{C}$. Повна інактивація досягається завдяки 15-хвилинній паровій стерилізації при $t=121^{\circ}\text{C}$. Зберігається стійкість антигену і до дії багатьох хімічних агентів. Часткова або повна його інактивація відбувається при обробці 3-5% хлораміном, 5% фенолом, етиловим і бутиловим спиртами [35, 40].

Методи ідентифікації поверхневого антигену й відповідних антитіл умовно поділяються на три напрямки:

- 1) реакція преципітації в гелі;
- 2) реакція зустрічного імуноелектрофорезу; реакція зв'язування комплементу; реакція латексаглютинації; метод флуоресцентних антитіл; імуноелектронна мікроскопія;

3) реакція зворотної пасивної гемаглютинації; радіоімунний та імуноферментний аналізи.

Як лабораторний матеріал використовують людську сироватку крові, плазму крові та інші зразки, взяті у хворих, донорів та гіперімунізованих тварин (кролів, морських свинок, мишей). Широке застосування серед лабораторних та наукових досліджень знайшли методи третьої групи. Найбільш точним методом визначення є радіоімунний, проте для лабораторної практики він довготривалий та складний у виконанні. Центральне місце при цьому займають діагностичні системи для імуноферментного аналізу, основними перевагами яких є висока антигенчутливість (від 0,05 до 0,1 нг/мл), експресність та можливість проведення масових обстежень [41].

При позитивному перебігу хвороби за фази реконвалесценції у сироватці хворих виявляються антитіла до поверхневого антигену – анти-HBs, які свідчать про розвиток імунної відповіді проти реінфекції. Зазвичай виявляють антитіло через 3 - 4 тижні після елімінації антигену, у так званій фазі «вікна». Тривалість фази вікна може варіювати від 1 місяця до 1 року, в залежності від стану імунної системи хворого. Максимальна концентрація досягається через 1-2 роки, згодом, титр антитіл знижується до граничного порогу виявлення. Накопичення анти-HBs у крові є найбільш інформативним тест-контролем, що підтверджує ефективність вакцинації проти ВГВ-інфекції [36].

3.2. Гібридомна технологія

Розроблена у 1975 році Д. Келером і Ц. Мілстейном вихідна технологія одержання моноклональних антитіл зазнала значних модифікацій та інноваційних видозмін. У літературному огляді наведено повну процедуру одержання цільового продукту лабораторним методом. Технологія напрацювання антитіл на підприємствах масового виробництва передбачає відновлення вже виділеного та сертифікованого штаму гібридних клітин. Зразки штамів гібридом зберігаються в клітинних банках або продаються як готовий продукт біотехнологічними компаніями. Застосування готової гібридної

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						40
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

культури при масовому нарощуванні поширена практика великих підприємств та значним чином спрощує виробничий процес. Проведення імунізації коштовний та довготривалий процес, який потребує безлічі реактивів, утримання лабораторних тварин, при чому не завжди закінчується успішно.

Повна технологія отримання гібридом Келера та Мілстейна включає наступні етапи:

I – імунізація тварин;

II – гібридизація: підготовка клітин до злиття (фузії) та злиття;

III – селекція – відбір гібридом, які утворюють антитіла потрібної специфічності;

IV – клонування гібридомних клітин;

V – масове напрацювання – одержання культуральної рідини або асцити, які містять антитіла, і виділення антитіл.

Вся процедура від початку імунізації тварин до виділення чистих антитіл триває в середньому 3-4 місяці (див рис 3.4) [11].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		41

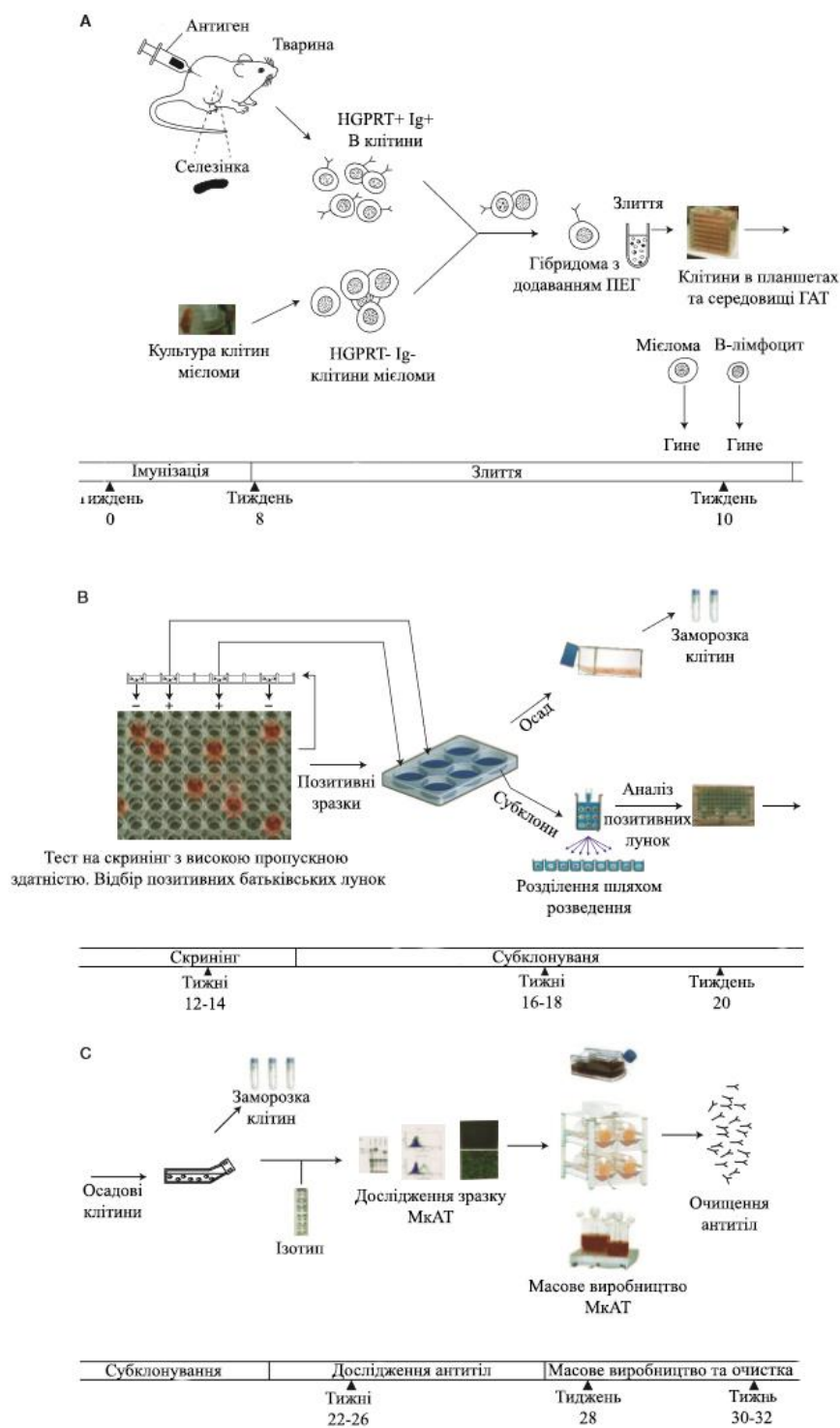


Рисунок 3.4. Повна схема гібридомної технології [42].

3.3. Імунізація тварин

Основне завдання проведення процесу імунізації полягає у штучному збільшенні частки клітин, що продукують антитіла заданої специфічності, і переведення клітин у функціональний стан, при якому вони здатні зливатися і

утворювати антитілоутворюючі гібридні клітини. Для експерименту відбирають тварини у віці 3-4 місяці, не залежно від статі, основною умовою допущення яких є посилена імунна відповідь на введений імуноген. Забір крові для контрольного визначення проводять із хвостової вени через тиждень після остаточної імунізації. Якщо в сироватці виявили достатній титр активно проліферуючих клітин, то за 3-4 дні до вилучення селезінки для подальшого злиття клітин, проводять останнє введення імуногена. Іноді важко інтерпретувати результати тестування крові, оскільки сироватка містить складну суміш антитіл. Неоднозначно, що всі дані антитіла були утворені секреторними клітинами селезінки, а також, що саме ці антиген-реактивні клітини будуть переважно синтезувати антитіла у ході імунної відповіді на повторне введення антигену [7, 11].

При імунізації тварин, імунна відповідь виробляється на всі антигенні детермінанти всіх компонентів введеного матеріалу. Це значно ускладнює відбір клонів, що продукують антитіла до необхідних антигенних детермінантів, адже їх частка може бути вкрай незначною. Через це, за можливості для імунізації застосовують очищені антигени, принаймні на останніх етапах імунізації.

Конкретна схема імунізації сильно залежить від природи антигену і його імуногенності, тому для підсилення імунної відповіді застосовувати різні ад'юванти. Найбільшого поширення отримав повний ад'ювант Фрейнда. Антиген вводять неодноразово – поступово, що необхідно для розвитку сильної імунної відповіді. У деяких випадках достатньо й однієї процедури імунізації. Для більшості антигенів можна використовувати наступні схеми імунізації: [7].

- Введення емульсії антигену та повного ад'юванта Фрейнда проводять ін'єкцією в середину черевної порожнини миші. Через три тижні, проводять повторне введення розчину зі зменшеним обсягом агентів. Для перевірки кількісного вмісту антитіл у крові, відрізають кінчика хвоста та відбирають зразок крові. Якщо титр антитіл вважається занадто низьким ($\geq 1/1000$) проводять додаткові ін'єкції кожні два тижні до досягнення необхідних показників. Останню імунізацію роблять внутрішньовенно через хвостову

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						43
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

вену, через три доби тварини забиваються, з виділеного матеріалу готується суспензія клітин селезінки для гібридизації [43].

- Імунізацію проводять в подушечки задніх лапок мишей. Перші дві ін'єкції здійснюють з повним ад'ювантом Фрейнда, а третю – без нього. Інтервал між ін'єкціями складає 2-3 дні. Імунізація продовжується протягом 7-8 днів. На третій день після останньої ін'єкції антигену, тварину забивають, шляхом дислокації шийних хребців, видаляють підколінні та пахові регіонарні лімфатичні вузли та проводили гібридизацію лімфоцитів, отриманих з лімфовузлів, із клітинами мієломи sp 2/0 [44].
- Іншим способом є успішна іммобілізація антигену на частинках пластику з подальшим здійсненням імунізації в середину черевної порожнини, без ад'юванта. Деякі дослідники вважають за краще уникати застосування ад'юванта Фрейнда, оскільки він може стимулювати розвиток гранульом. Як заміну використовують адсорбований на квасцях антиген в суміші з інактивованими клітинами *Bordetella pertussis* [7].

Останнім часом, активно розвиваються методи імунізації поза організмом. Імунізація *in vitro* має ряд істотних переваг: а) більш короткий період імунізації, до 4-5 діб; б) необхідна значно менша кількість антигену; в) до багатьох антигенів можна отримати більш виражену імунну відповідь (частково шляхом зниження дії антиген-толерантності та супресії); г) легше перевіряти фактори, що впливають на ефективність імунізації [7].

Введений в середину черевної порожнини або внутрішньовенно, антиген досягає селезінки, і з цього моменту даний орган стає джерелом антитілопродукуючих клітин, які використовуються у наступних етапах гібридомної технології [7]

Сучасні методи імунізації *in vitro* основані на двох системах культивування лімфоцитів, розроблених у кінці 1960-х років: метод суспензійного культивування та вирощування клітин в діалізній камері. Основним недоліком яких є велика частка IgM-утворюючих клонів. Це пов'язано з тим, що при

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						44
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

імунізації *in vivo* клітини відбирають під час вторинної імунної відповіді, при якій утворюються, в основному, антитіла IgG класу, тоді як при *in vitro* реакція йде за первинного типу, для якого характерна продукція IgM антитіл [7].

3.3.1. Приготування суспензії клітин селезінки

Доцільним способом отримання спленоцитів, є вимивання їх з селезінки, а ніж подрібнення чи роздавлювання органу в гомогенізаторі. При застосуванні першого методу, отримують чисті однорідні суспензії з високою життєздатністю клітин. Клітини підтримують у середовищі RPMI - 2% ЕТС. Іноді можна зіткнутися з патологічними змінами селезінки, що містить надлишкову кількість клітин гранулоцитарного або моноцитарного ряду, що може бути причиною невдалої гібридизації [11].

Тварину забивають, шляхом дислокації шийних хребців. Тушку занурюють у 70% розчин етилового спирту та поміщають на препарувальний столик для подальших маніпуляцій. У стерильних умовах, роблять повздовжній розріз черевця. Видаляють селезінку, після чого, поміщають її в невелику кількість теплового середовища у чашці Петрі (див. Рисунок 3.5). Для вимивання лімфоїдних клітин, використовують наповнені поживним середовищем шприци, послідовно проколюючи невеликі ділянки селезінки та випускаючи рідину, спочатку з одного шприца, потім з іншого. Отриману суспензію клітин центрифугують для осадження крупних частинок тканини селезінки. Осад ресуспендують у середовищі без сироватки та підраховують кількість живих лімфоцитів в камері за допомогою методу виключення барвника трипанового синього. Загальна кількість отриманих клітин, зазвичай, становить $0,6-1,2 \cdot 10^8$, із них життєздатних близько 90%. У більшості експериментів 10^8 клітин селезінки зливають зі 10^7 клітинами плазмацитоми [11].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		45



Рисунок 3.5. Вилучення селезінки: А – препарована миша; Б – селезінка, В – спленоцити при мікроскопіюванні [42].

3.4. Гібридизації (злиття) донорних клітин

На сьогодні, відомі різні модифікації вихідного методу Келера та Мільштейна. Визнання набули методики Галфре та Кеннета, однак практично кожен науковий центр прагне розвивати свою власну методику, якій надає перевагу.

Необхідно враховувати, що клітинні лінії з часом змінюються – здатність до злиття знижується або ж синтез антитіл гібридними лініями стає нестабільним. Тому краще при дослідженні мати не одну контрольну лінію клітин, а принаймні три. Перші досліди по злиттю потрібно провести з усіма лініями, і клітини, які дали найкращі результати, заморозити в достатній кількості. Успіх в отриманні гібридом, в значній мірі, визначається правильною підготовкою мієломних клітин. [7].

Технологічно зручно та цілеспрямовано ставити паралельно два експерименти з невеликою різницею в часі, використовуючи селезінки двох мишей. Супернатанти спелоноцитів та мієломних клітин одним рухом вливають в універсальний контейнер та ретельно перемішують вміст. Отриману суміш центрифугують, після чого подальшу роботу проводять тільки з осадом клітин.

У перших роботах з отримання гібридом, для злиття мембрани клітин з утворенням синцитія, використовували вірус Сендай, інактивованого ультрафіолетовим випромінюванням. Відтоді, були знайдені більш ефективні методи злиття клітинних гібридів. Серед реагентів, що порушують цілісність мембран, найбільш часто використовують 50% розчин поліетиленгліколю (ПЕГ).

Вважають, що він зменшує поверхневий заряд і сорбує на своїй поверхні воду, полегшуючи цим взаємний контакт плазматичних мембран сусідніх клітин. Розчин ПЕГ доцільно готувати на воді, а не на звичайному поживному середовищі, оскільки при такій концентрації реагент стає гігроскопічним [12]. Процедура гібридизації займає півгодини. Упродовж цього часу, клітинний осад розподіляють по стінці пробірки, шляхом обертання та струшування в горизонтальному положенні. Час від часу, пробірку з осадом клітин поміщають на водяну баню. Такі дії направлені для того, щоб наблизити клітини між собою для утворення міжклітинних контактів і як наслідок злиття. Періодично до суміші додають тепле поживне середовище RPMI-1640 [11].

Після проведеної роботи, утворений розчин центрифугують та ресуспендують у теплому середовищі ГАТ. Суміш клітин розподіляють по одній краплі в кожен лунку планшетів для культивування. Заповнені планшети, ставлять один на одного та переносять в CO₂-термостат зі зволженим повітрям. На ранніх стадіях культивування надзвичайно важливо, щоб газовий вміст термостата був достатньо насичений вологою і підтримувався достатній рівень вуглекислого газу, оскільки рідина може випаровуватися, тому на п'ятий день, у кожен лунку додають невелику кількість середовища ГАТ [11].

Активний ріст клітин супроводжується виділенням кислих продуктів метаболізму, що зумовлює набуття жовтого кольору середовища у більшості лунок. Поява такого забарвлення, є сигналом для повної заміни середовища, що унеможливорює ріст «фонових» антитіл, які утворюють залишки негібридизованих антитілоутворюючих клітин селезінки [11].

Протягом перших двох днів, як правило, можна спостерігати лише окремі клітини (за розміром і морфологією схожі на плазмацити) на фоні згрупованих клітин селезінки. На четвертий день, якщо гібридизація пройшла успішно, в деяких лунках повинні з'явитися невеликі колонії гібридом. На п'ятий день, коли в лунки додатково додають середовище, в деяких з них повинні виявлятися великі колонії гібридом, які на сьомий день повинні складати 20-100% колоній від загального числа лунок (див. Рис. 3.6). При цьому, клітини

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		47

селезінки утворюють скупчення, які інтенсивно ростуть і загрожують подальшому розвитку повільно зростаючим клітинам гібридом. Слід зазначити, що багато дослідників вважають за краще додавати середовище ГАТ одразу ж після злиття, а культури не чіпати кілька днів (навіть не відкривати CO₂-інкубатор), пояснюючи це тим, що клітини після злиття дуже чутливі до змін зовнішньої температури та сторонніх впливів [7].

Успішна процедура злиття вимагає не тільки хороших умов і збагаченого поживного середовища, але і пригнічення росту життєздатних клітин селезінки. До останніх можуть належати макрофаги, фібробласти, попередники тучних клітин, лімфоцити, які утворюють агломерати. Життєздатність цих клітинних структур залежить від стану їхньої активності в селезінці до моменту забою тварини. Застосування ад'ювантів підвищує цю активність, тому одна з причин додавання до клітин після злиття холодної лужної кінської сироватки полягає в тому, що вона пригнічує ріст «фонових» клітин, одночасно стимулюючи ріст клітин гібридами. Конкуренція у рості можлива тільки на дуже ранніх стадіях. Як тільки гібридома стабілізувалася, її здатність до розмноження випереджає таку ж властивість всіх інших типів клітин. [11, 45].

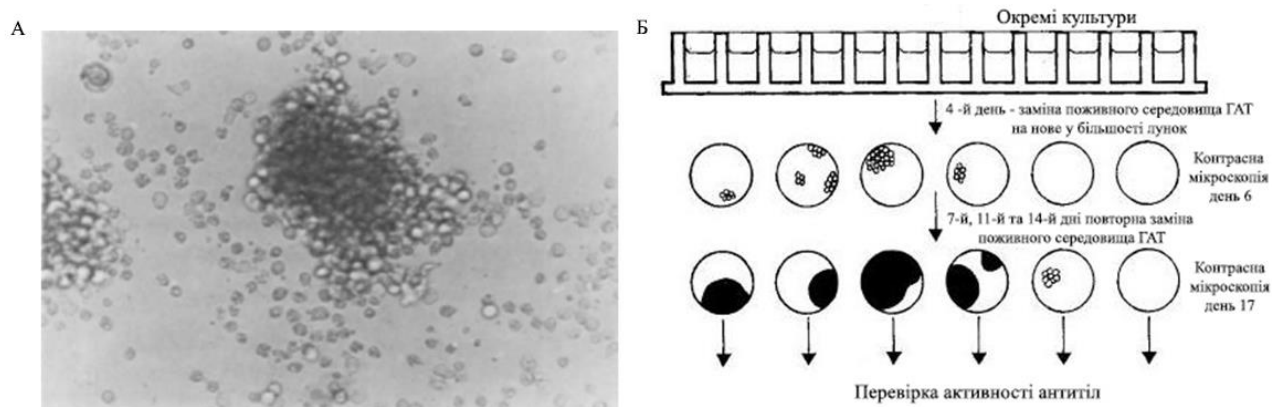


Рисунок 3.6. А – гібридома на перших днях росту, збільшення 500х;
Б – приклади росту культур гібридом у лунках планшету [35].

3.5. Бактеріальна контамінація гібридом

Час від часу, у лабораторній практиці можлива бактеріальна контамінація представниками роду *Mycoplasma*, що за певними даними може охоплювати від 5 до 15% усіх клітинних ліній. Особливістю бактерії є те, що вона не вбиває гібридну клітину, а росте на її поверхні. Негативні ефекти бактерій, пов'язані зі споживанням поживного середовища та втручанням у метаболічні шляхи клітини-господаря, що іноді призводить до цитогенетичного пошкодження клітинного апарату. Бактерії швидко набувають стійкості до антибіотиків. Вважається, що потенційним джерелом бактерій є сироватки, зокрема великої рогатої худоби, тому для запобігання розвитку паразитів мікробного походження, сироватки піддаються тривалій температурній обробці. Іншим способом попередження мікоплазмозу є розробка спеціальних поживних середовищ, що містять блокуючі агенти [13].

Існує ряд методів визначення наявності в культурі мікоплазм. Найпростішим методом, нині вважається, взаємодія бактерій з барвниками, специфічними до ДНК, фарбовані препарати яких аналізують за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Усунення мікоплазми складний процес, який слід застосовувати лише в тому випадку, якщо клітинна лінія є особливо цінною. Реагентом, який доступний для лікування клітинних ліній, заражених мікоплазмою, є ципрофлоксацин, що входить до групи антибіотиків та інгібує ДНК-гіразу. Застосування агенту призводить до зниження контамінації, проте не усуває її повністю [46].

3.6. Селекція гібридом

Селекція, у більшості дослідів, відбувається у два етапи. Спочатку, культуральну рідину аналізують на вміст специфічних антитіл та їх активність. Відібраний позитивний супернатант, піддають скринінгу з використанням тест-панелі антигенів, щоб виявити, чи відбувається селективне зв'язування, виявлених антитіл, до необхідного антигену.

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						49
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

Лунки з потрібними гібридами складають лише невеликий відсоток від загального числа лунок антитілоутворюючих клітин. Успіх процедури гібридизації для отримання специфічних антитіл, залежить від ретельного виконання скринінгу. Якщо при аналізі було виявлено мишачі імуноглобуліни в незначній концентрації, то необхідно продовжити культиваційний період, після чого взяти повторні проби для скринінгу.

Вибір використовуваного методу скринінгу залежить від подальшого призначення моноклональних антитіл, у залежності від напрямку застосування, методи відрізняються за якісними реакціями та матеріалами.

Тест, який використовується для скринінгу, повинен задовольняти наступні критерії:

- Бути технологічно простим, для точної та більш інформативної роботи технічного персоналу лабораторії;
- Тест достатньо автоматизований для швидкого скринінгу великої кількості проб з лунок, використовуючи багатоканальну піпетку (8 проб за один раз) і проводячи тестування в планшетах;
- Чутливість тесту повинна бути не менше 1 – 10 мкг антитіл в 1 мл;
- Для перевірки вірогідності результатів скринінгу, необхідно проведення постановки позитивних і негативних контролів.

Існує певна схема виявлення специфічного зв'язування антитіл до поверхневих та корпускулярних антигенів. Клітини-мішені можуть бути живими, зафіксованими глутаровим альдегідом; висушеними на склі або ж бути присутніми в заморожених гістологічних зрізах. Тест є непрямим, тому реагентом для другої стадії можуть бути антимишині імуноглобуліни вівці, кози або кролика, мічені флуоресцентом, ферментом або радіоактивним йодом. Пробу супернатанта додають до клітин-мішеней в невеликому обсязі, після нетривалої інкубації, суспензію розбавляють та осаджують центрифугуванням. Супернанат інкубують з відповідними розведеннями полівалентного антимишиного імуноглобуліну, кон'югованого з флуоресцентом. Клітини реєструють під

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						50
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

флуоресцентним мікроскопом або за допомогою проточного цитофлуориметра (див Рис. 3.7) [11].

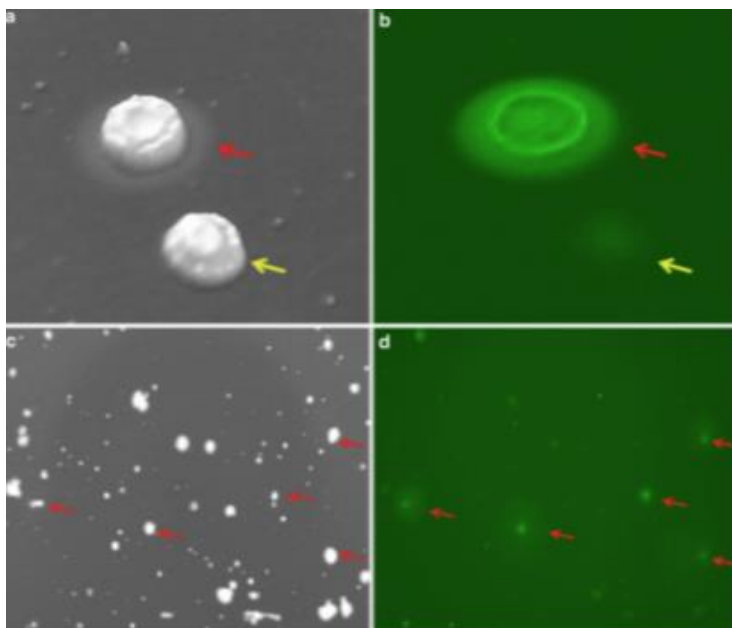


Рисунок 3.7. Скринінг дискретних колоній під білим світлом (а, с) і під флуоресценцією (b, d). Клони клітин, які продукують високий та низький рівень антитіл позначено, відповідно, червоними та жовтими стрілками. Навколо колоній лише з високим титром антитіл проявляється зовнішня флуоресцентна інтенсивність [12].

Основними альтернативними тестами скринінгу антитіл до розчинних антигенів вважають ELISA, PIA або реакція гемаглютинації. У перших двох випадках використовують планшети для мікротитрування з попередньо адсорбованим антигеном, додаючи у кожну лунку досліджуваний супернатант. Після нетривалої інкубації, у лунки вносять антиглобуліновий реагент до імуноглобулінів миші, кон'югованого з ферментом або радіоактивним йодом. Після годинної інкубації в залежності від обраного тесту виявляють ферментативну активність (ELISA) або вимірюють рівень радіоактивності в лунках (PIA) [47].

У реакції пасивної гемаглютинації, еритроцити сполучаються з антигеном за допомогою хлорного хрому. Суть реакції полягає у взаємодії супернатанта зі суспензією еритроцитів барана навантажених певним антигеном. [11].

У буфер для розведення з метою перевірки специфічності моноклональних антитіл може бути доданий конкурентний агент. Наприклад, якщо потрібно відібрати моноклональні антитіла до IgG₂ людини, то використовують еритроцити барана, навантажені IgG₂, а суспензію IgG₁ додають до буфера для розведення. У цьому випадку тільки ті МкАТ, які специфічно розпізнають IgG₂, будуть аглютинувати навантажені антигеном еритроцити барана, а МкАТ, які зв'язуються з двома типами імуноглобулінів, взаємодіють з надлишком лише IgG₁ в буфері для розведення [11].

3.7. Клонування гібридних ліній

Наступним етапом в технології отриманні МкАТ є клонування, суть якого у виділенні стабільних клонів гібридомних клітин. Для новоутворених гібридом характерна висока нестабільність, пов'язана з втратою хромосом, іншою вагомою причиною є поява небажаних «фонових» антитіл.

До основних методів клонування клітин відносяться клонування методом лімітуючих розведень, клонування в напіврідкому агарі та клонування за допомогою приладу – проточного цитофлуориметра.

Найбільш поширеним лабораторним методом є метод лімітуючих розведень. Якщо культивування проводять в 96-лунковому планшеті, то частка лунок, в якій спостерігається ріст клітин, підпорядковується розподілу Пуассона:

$$f(0) = e^{-\lambda} \quad (3.1)$$

де $f(0)$ – фракції лунок, у яких відсутній ріст; λ – середнє число клітин на лунку. При $\lambda=1$, то $f(0)=0,37$.

Для того щоб отримати ймовірність тільки одного клону в лунці, то у понад 37% лунок не повинно спостерігатися росту клітин. Оскільки ефективність клонування рідко буває рівною 100%, клітини необхідно засівати при щільності 10, 5 і 0,5 клітин на лунку. У тих планшетах, на яких спостерігається ріст у

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						52
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

половині лунок – містяться ізольовані клони. При першій пробі клонування, можна отримати невелику частку клонів, тому завжди необхідно проводити повторне клонування, при якому частка клонів буде збільшуватись. Для процедури можна застосовувати клітини живильного шару та різні типи сироваток, навіть ті, що були залучені на попередніх етапах [7].

Метод лімітуючих розведень – це три стадійна процедура, яка вимагає багато часу та матеріалів.

Для процесу клонування необхідно відібрати найбільш життєздатні гібридами з високим рівнем продукції антитіл та гарними ростовими показниками. Мета першої стадії – відокремити кращу антитілоутворюючу субкультуру, від первісної.

Для досліду використовують центральні лунки планшету, а лунки, розміщені по периферії планшету, заповнюють середовищем, що містить антибіотики, задля запобігання випаровуванню вологи та концентрування середовища ГАТ в лунках. Клітини гібридами первісної культури упродовж тижня інкубують в CO₂ термостаті зі зволженим повітрям. У процесі інкубації, клітини в лунках утворюють моношар, супернатанти яких досліджують на вміст антитіл. Доцільно попередньо протестувати нерозбавлений зразок та два його розведення (1:4 та 1:16). З тих лунок, де антитіла містяться в найбільш високих титрах, відбирають культури для подальшого клонування та проводять розсів для другої стадії методу [11, 48].

Мета другої стадії – відібрати лінії гібридних клітин, утворених з однієї клітини та здійснити розсів гібридом на фідерний шар клітин селезінки.

Суспензію спленоцитів готують незадовго до постановки експерименту для перевірки мікробіологічної чистоти. Ймовірно, попереднє відстоювання пригнічує ріст «фонових» клітин селезінки в лунках, де проводять клонування.

Як і в першому етапі, у роботі і використовують тільки центральні лунки планшету, а розташовані по периферії лунки заповнюють середовищем з антибіотиками. Лунки першого ряду заповнюють середовищем ГАТ, а кожні наступні лунки кожного ряду заповнюються суспензією клітин селезінки.

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		53

У кожен із задіяних рядів, який містить тільки середовище ГАТ, додають суспензію з найвищою концентрацією клітин. У лунки другого ряду додають суспензію з меншою концентрацією, таким чином у кожній лунці міститься по 10 клітин. Другий і всі наступні ряди містять фідерний шар клітин селезінки. У лунках третього ряду вносять 5 клітин на лунку, в лунки четвертого і п'ятого ряду – суспензії з концентрацією 1 клітина на лунку, у лунки шостого ряду вносять суспензію з концентрацією 1 клітина на кожні дві лунки (див. Рис. 3.8). Напрацьований планшет інкубують у CO₂-термостаті.

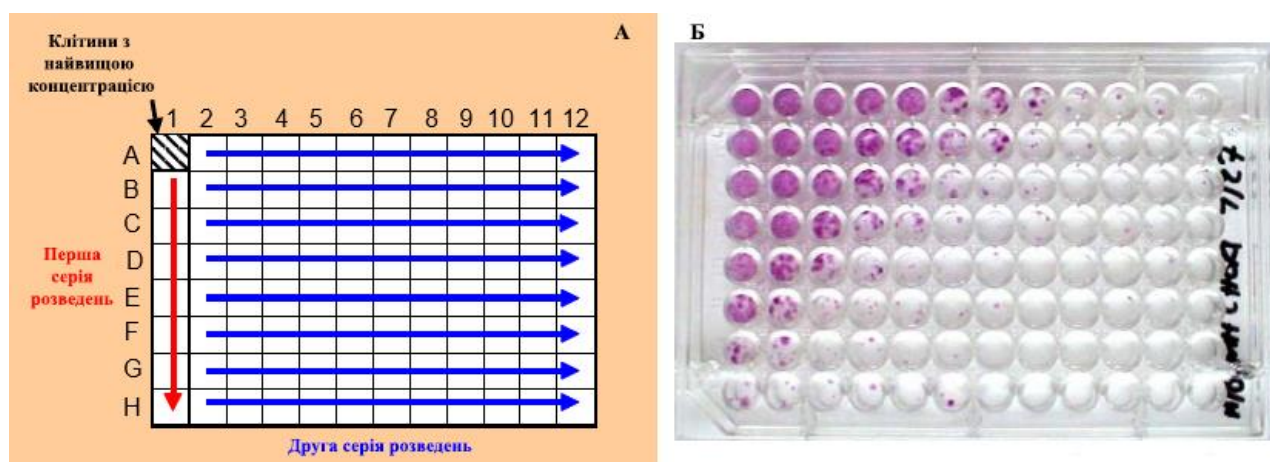


Рисунок 3.8. А – схематичне зображення проведення клонування, використовуючи всі 96 лунок планшету; Б – приклад забарвлених клітин. Найбільша концентрація клітин містяться в зоні вихідного розчину, а на периферії наявні лише поодинокі клітини [49].

Якщо в результаті активного росту колоній, змінюється колір середовища, його негайно замінюють. При цьому слід дотримуватися обережності, щоб не порушити клітинний шар, оскільки гібридні клітини надалі будуть рости на фідерному шарі спленоцитів у вигляді окремих колоній.

Після інкубації, під час візуального огляду гібридних клонів в інвертованому мікроскопі, відбирають тільки ті колонії, які росли в лунках, з концентрацією 0,5-1 клітина на лунку. Коли колонії чітко видно неозброєним оком, вони, зазвичай, досить великі, щоб перевірити їх антитілоутворюючу

активність, тому для аналізу відбирають три окремі колонії, які продукують високий титр антитіл з лунок які засівали з розрахунком 0,5-1 клітин [11, 25].

Для остаточної перевірки, що отримані клони від однієї клітини, а не з двох, доцільно повторити описану вище процедуру другої стадії для кожної з трьох відібраних колоній. Повторення процедури клонування одиничних клітин має певну перевагу, при перевірці індивідуальних колоній, отриманих після третьої стадії процедури, вони повинні продукувати антитіла. Таким чином, гібридомна лінія, яка під кінець набуває значних обсягів, – це лінія, утворена від однієї клітини. Доцільно пересадити три окремі колонії після проведення другої стадії методу, оскільки одна або дві колонії можуть відрізнитися низькою ефективністю росту.

Колонії, що виникли з однієї клітини, вирощені впродовж третього методу та проаналізовані на секрецію антитіл, переносять у нові планшети для мікротитрування. Спочатку культивування проводять в лунках планшетів для мікротитрування, потім поступово переносять в більші лунки, а в кінці культують у невеликих флаконах. Ампули з дослідними зразками заморожують в рідкому азоті для зберігання [11, 49].

3.8. Масове нарощування МкАТ

Після відбору гібридомних клітин, що синтезують необхідні дослідникам антитіла, можна приступити до наступного етапу – масовому нарощуванню з метою отримання великої кількості моноклональних антитіл. Основними джерелами виділення антитіл є культуральний супернатант, асцитна рідина, отримана в результаті інтраперитонеальної ін'єкції гібридних клітин в черевну порожнину мишам та при культивуванні в біореакторах [7].

3.8.1. Культуральний супернатант

Культуральна рідина не містить інших мишачих імуноглобулінів, окрім моноклональних антитіл, проте в ній присутня велика кількість білків ЕТС.

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		55

Для отримання оптимального вмісту антитіл в культуральній рідині гібридомної клітини вирощують за високої щільності (з'являється жовте забарвлення поживного середовища), однак важливо не допустити того, щоб клітини росли до такої міри, щоб виникла загроза зниження їх життєздатності. Культуральну рідину збирають та центрифугують для повного видалення клітин. Рідину, зібрану з декількох флаконів з однією гібридомною лінією, зливають в чисті скляні бутлі. Концентрація антитіл в культуральній рідині становить декілька мікрограм на мілілітр [11, 47].

3.8.2. Асцитна рідина

За 1-3 тижні до ін'єкції клітин гібридами, мишам лінії Balb/c, у віці 3-4 місяців проводять інтраперитонеальну ін'єкцію пристану (2,6,10,14-тетраметилпентадекану), який стимулює утворення асциту. Кожній миші вводять щонайменше $10^6 - 10^7$ клітин у фосфатно-сольовому розчині. Гібридома розвивається у вигляді асцитної пухлини з концентрацією антитіл, приблизно, в 10-500 разів більшій, ніж у культуральній рідині [11].

Для відбору асцитної рідини: мишу забивають дислокацією шийних хребців; роблять надріз таким чином, щоб забезпечити доступ в перитонеальну порожнину та відкачують її вміст пастерівської піпеткою. Отриману рідину центрифугують при великому числі оборотів для видалення клітин і клітинного дебрису. Супернатант найкраще зберігати при -20°C , розливши на аліквоти по 1 мл, або у великому обсязі, якщо антитіла будуть застосовувати у подальшому очищенні [11].

3.8.3. Культивування у біореакторах

Після створення клітинної лінії починається підбір та оптимізація процесу культивування, спочатку в планшетах, потім у колбах і настільних біореакторах об'ємом 1-5 л. У результаті скринінгу сотень і тисяч клонів вибирають клон-продуцент з найкращими характеристиками та переходять до пілотного

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						56
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

культивування в реакторах об'ємом 10-25 л, а потім масштабують процес до більших розмірів.

Зазвичай клітини, що продукують антитіла, культивують в біореакторах-ферментерах об'ємом від 100 до 25 000 л. Традиційним способом культивування є процеси *batch* і *fed-batch*. У першому випадку всі компоненти середовища та клон-продуцент завантажують в реактор на кілька днів, після чого збирають культуральну рідину для виділення білка. У другому випадку в середовище періодично додають поживні речовини [25].

Найважливішим фактором забезпечення високих виходів білка є склад культуральної рідини. Прогрес в цій області триває, і якщо в 1990-х роках виходили антитіла становили 0,1 г/л, у 2010-х – до 5 г/л, то нині вдається досягати вихід у 10 г/л і більше. Такі успіхи стали можливими завдяки переходу від середовищ, що містять сироватку тварин до безсироваткових: спочатку використовувалися гідролізати білків, а зараз – повністю хімічні середовища з чітко визначеним складом. Іншою причиною є використання різних типів середовищ в залежності від стадії технологічного процесу, адже варіабельність складу поживного середовища погіршує параметри культивування.

Для підвищення продуктивності застосовують найбільш оптимальні параметри середовища зі зворотним зв'язком: температури, рН, сольового складу, рівнів O_2 і CO_2 , що дозволяє домогтися зниження концентрації токсичних побічних продуктів (молочної кислоти, аміаку) і більш плавної витрати поживних речовин.

У даний час, спостерігається тенденція до переходу на безперервні процеси: на так зване перфузійне культивування, при якому свіже поживне середовище безперервного подається до клітинної культури, а продукт видаляється з неї. Такий підхід до культивування клітин краще автоматизується, дає продукт більш високої якості та зі збільшеним виходом [25].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						57
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

3.9. Збереження клонованих зразків

Першочергове значення для здійснення контролю якості має створення запасу заморожених гібридомних клітинних ліній із зазначенням дати заморозки. Заморожувати зразки культивованих клітин, слід на кожній фазі росту. Зразки асцитних рідин заморожують із зазначенням номера кожного пасажу. Розглянемо ефективні методики збереження культури клітин, шляхом заморожування та відновлення зразків розмороженням [7, 11].

3.9.1. Заморожування клітин

Відібрані зразки клітин здорової культури, центрифугують з певною аліквотою на кожну ампулу, яка буде заморожуватись. Видаливши супернатант, ресуспендують клітини в кріопротекторах, зокрема у холодній ЕТС, що містить 5% диметилсульфоксиду, або можливе застосування 50% розчину гліцерину, охолодженого до -32°C . Отриману суспензію клітин переносять в поліпропіленові ампули, які підписують, зазначаючи код клітинної лінії та дату. Ампули поміщують у велику коробку з кришкою та товщиною стінок 2-3 см. Коробку переносять у морозильник на -20°C для короткої первинної температурної обробки, після чого коробку переносять в іншу морозильну камеру при -70°C для більш тривалої вторинної обробки. По закінченню, ампули поміщають у контейнер з рідким азотом для подальшого зберігання. Асцитну рідину також можна зберігати в замороженому вигляді, але в цьому випадку немає потреби у дотриманні стерильності. Технологія для заморожування асцитної рідини майже така як і для клітин, проте після проведення центрифугування, осад ресуспендують в ФСБ, а не в ембріональній телячій сироватці [11].

3.9.2. Розмороження клітин

Відновлення культури, потребує швидкого розмороження пробірки, у струмені гарячої води, до поки лід в пробірці не зникне. До перенесених в

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						58
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

універсальний контейнер клітин повільно, по краплях, додають тепле поживне середовище RPMI-1640, після чого отриманий розчин осаджують центрифугуванням. Виділений супернатант разом з середовищем ГАТ поміщають у лунки планшетів для культивування. Планшети інкубують у термостаті з регульованим складом атмосфери, а потім проводять розсів. Життєздатність відновлених клітин становить 50-78%. Час від часу, необхідно перевіряти вміст специфічних антитіл в культуральній рідині за допомогою певного набору контрольних антигенів. При цьому, важливо оцінити не тільки рівень специфічних антитіл, але й наявність домішок, виявлення яких може бути обумовлено мікробіологічною контамінацією гібридом клітинами іншої лінії, можливою при одночасному культивуванні багатьох ліній [11].

3.10. Очистка антитіл

Найважливішою вимогою на стадії виробництва і на стадії очищення антитіла є сталість складу продукту. Оскільки антитіло – складний об'єкт і продукується у біологічній системі (в клітинах), молекули виходять не однакові, а з варіаціями (див. Рис. 3.9). Мета розробки процесу виробництва та очищення – домогтися того, щоб ці варіації не впливали на фармакологічні характеристики продукту, його стабільність, і не змінювалися від однієї партії товару до іншої. Для цього проводять валідацію процесу виробництва – експериментальне підтвердження, що процес забезпечує отримання продукту з належними характеристиками [25].

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>	А
						59
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

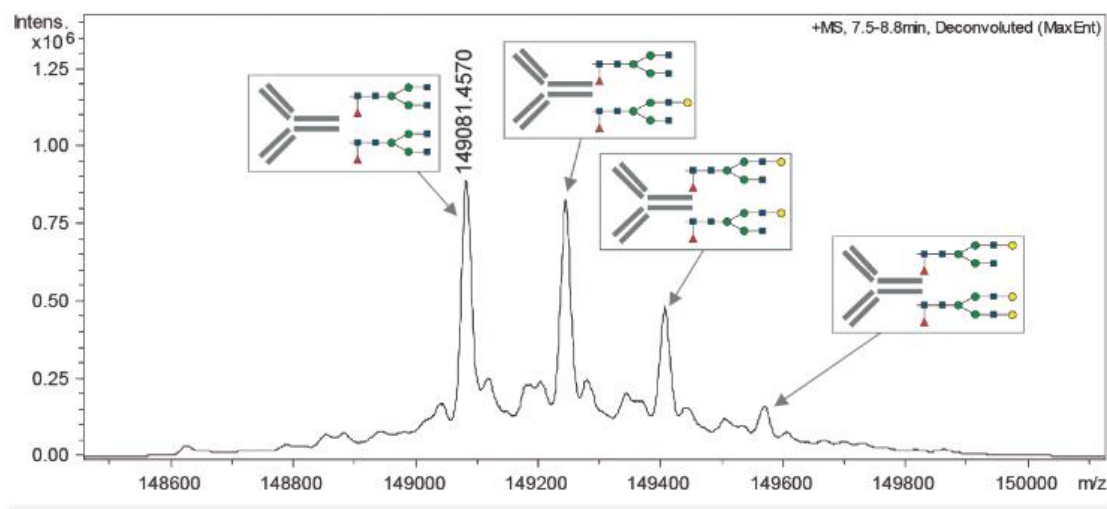


Рисунок 3.9. Профіль глікозилювання визначають методом мас-спектрометрії. На спектрі видно типову картину гетерогенності препарату антитіл [27].

На деяких проміжних і на фінальному етапах очищення, склад продукту контролюють аналітичними методами. Обов'язково стежать за:

- бактеріальними ендотоксинами;
- наявністю вірусів;
- білками та ДНК продуцента, залишками культури (антибіотиками, сироваткою), неорганічними солями, розчинниками, носіями та ін.
- фізико-хімічними властивостями (вуглеводним складом, дисульфідними містками, варіабельністю N- і C-кінцевих залишків).

Частина цих показників входить в специфікацію на субстанцію, з якої потім отримують готовий препарат [25, 50].

3. 11. Блок-схема отримання продуцента

Графічна схема отримання промислового продуцента наведена на Рисунку 3.10.

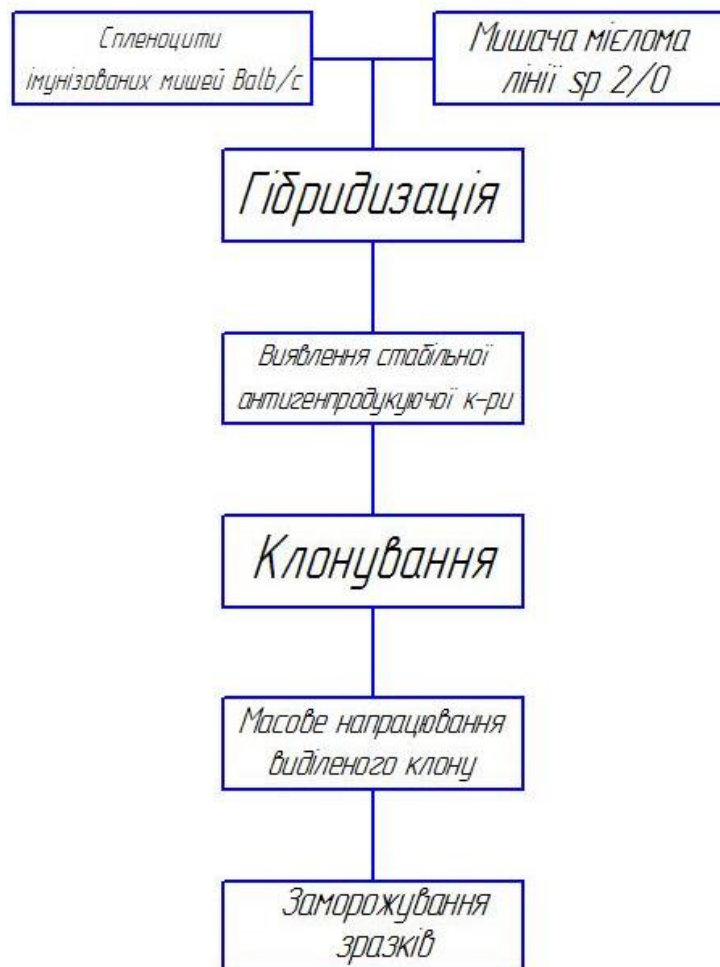


Рисунок 3.10. Блок-схема отримання продуцента

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції

Назва готового продукту: субстанція моноклональних антитіл специфічних до білка HBsAg вірусу гепатиту В.

Категорія та номер чинного НТД: СТ-Н МОЗУ 42-3.17:2015. Лікарські засоби. Розробка, виробництво, характеристика та специфікації моноклональних антитіл і супутніх продуктів; ISO 13485:2003.

Призначення продукції та можливі галузі використання: готовий продукт стосується імунохімії, біотехнології і лабораторної діагностики та може бути використаний у ході імуноферментного аналізу, як основний компонент тест-системи або реагент позитивного контролю імуноферментної реакції, а також для аналізу імунної відповіді до антигену.

Зовнішній вигляд та фізико-хімічні характеристики:

Таблиця 4.1. Характеристика готової продукції [51, 52].

Найменування	Показник
Структура	Рідкий клітинний супернатант
Середовище	0,01М ФСБ; 0,09% NaN ₃
Кількість	1 мл
Концентрація	6,8 мг / мл
Молекулярна вага	14 390 Да
Кон'югат	Некон'югований
Константа афінності	$4,0 \cdot 10^{10}$ моль/л
Титр у культуральній рідині	1:1000
pH	7,2-7,4
Ендотоксин	<2EU / мг
Чистота	> 95%
Спосіб очистки	Афінна хроматографія з білком А-сефарозою
Ізотип	IgG _{2a}
Джерело	Гібридизація клітин мієломи sp2/0 зі спленоцитами мишей лінії Balb/c

					ДП 6123.00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Шебеда Д. С.			РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Стадія	Арк.
Конс.							62
						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ	
Керівн.		Дзигун Л. П.					
Затв.							
						Аркушів	135

Вимоги до упаковки, маркування, транспортування, зберігання та термін придатності:

Субстанція зберігається у кріоампулі, поміщеній у резервуар з рідким азотом за температури -70°C . Такі умови зберігання забезпечують стабільність структури впродовж 12 місяців з дня консервації. Як кріосередовище застосовують суміш 5% ДМСО, 50% ЕТС та 45% DMEM. При транспортуванні, контейнер поміщують у сухий лід, для уникнення розмерзання. За лабораторного використання, зразки зберігають при -20°C , при дослідних роботах антитіла містяться при $+4^{\circ}\text{C}$, за умови, що вся субстанція буде використана впродовж 2-4 тижнів та надалі не буде піддаватись повторному замороженню.

За ДСТУ EN ISO 13485: 2003 «Медичні вироби. Системи управління якістю. Вимоги щодо регулювання». Маркування кінцевого продукту повинно містити:

- найменування підприємства-виробника;
- товарний знак підприємства-виробника (якщо є або при необхідності);
- назва субстанції;
- кількість та концентрацію продукту;
- спосіб підготовки компоненту до використання (при необхідності);
- номер серії;
- термін придатності;
- умови зберігання [53].

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовується у виробництві

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						63
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

Таблиця 4.2. Сировина, матеріали та напівпродукти, що використовується у виробництві.

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна речовина:			
1.1. 2-меркаптоетанол	Sigma-Aldrich кат. № M6250	Концентрація розчину	Компонент середовища RPMI- 1640
1.2. L-глутамін	Sigma-Aldrich кат. № G7513	Концентрація розчину	Компонент середовищ DMEM та RPMI-1640
1.3. Амоній сульфат	Sigma-Aldrich кат. № A4418	Концентрація розчину	Реагент на стадії концентрування
1.4. Білок А-сефароза	Sigma-Aldrich кат. № GE17-0780-01	Сорбційна здатність	Наповнювач хроматографічної колонки
1.5. Вода деінізована	ISO 3696:2003	Усі показники згідно вимогам НТД	Для приготування розчинів
1.6. Глюкоза	BAT «Ексімед», ФС 42У-5241-95, ФС 42-2419-86	Ростовий показник	Компонент поживного середовища
1.7. Ембріональна теляча сироватка	Sigma-Aldrich кат. № F4135	Концентрація розчину	Компонент кріосередовища
1.8. Імуноглобулінова мишача сироватка	Sigma-Aldrich кат. № I5381	Концентрація розчину	Реагент ELISA тесту
1.9. Натрій азид	Sigma-Aldrich кат. № S2002	Концентрація розчину	Компонент кріосередовища
1.10. Натрій бікарбонат	Sigma-Aldrich кат. № S5761	Концентрація розчину	Компонент середовищ DMEM та RPMI-1640
1.11. Паранітрофенол	Sigma-Aldrich кат. № 241326	Концентрація розчину	Концентрація розчину
1.12. Пеніцилін	Sigma-Aldrich кат. № P3032	Концентрація розчину	Компонент середовищ DMEM та RPMI-1640
1.13. Середовище DMEM	Sigma-Aldrich кат. № D5648	Концентрація розчину	Поживне середовище
1.14. Середовище RPMI-1640 з L- глутаміном	Sigma-Aldrich кат. № R8758	Концентрація розчину	Поживне середовище

Продовження табл. 4.2.

1.15. Стрептоміцин	Sigma-Aldrich кат. № 85886	Концентрація розчину	Компонент середовищ DMEM та RPMI-1640
1.16. Фосфатно- сольовий буфер	Sigma-Aldrich кат. № 17202	Концентрація розчину	Компонент середовища DMEM та кріосередовища
1.17. Фосфатно- сольовий буфер Дюльбека	Thermo Fisher Scientific кат. № 14200075	Концентрація розчину	Реагент ELISA тесту
1.18. Штам гібридом 95E1	—	Морфологія та фізіологічні ознаки	Продуцент МкАТ
2. Допоміжна сировина:			
2.1. Агар-агар	Merck, кат. № 101614	Концентрація розчину	Компонент ПС
2.2. Антисептичний засіб «Sterillium»	—	Умови зберігання	Розчин для обробки рук та робочих поверхонь
2.3. Вода водопровідна	ДСанПіН 2.2.4-171-10	Фізико-хімічні, органолептичні та санітарно- токсологічні показники	Розчин для мийки й ополіскування обладнання
2.4. Вапно хлорне	Первомайське ПП «Хімпром», ГОСТ 1692- 85	Концентрація розчину	Марка Б
2.5. Дріжджовий екстракт для мікробіології	Merck, кат. № 103753	Ростовий показник	Компонент ПС
2.6. Калій бікарбонат	Sigma-Aldrich кат. № 237205	Концентрація розчину	Компонент хромової суміші
2.7. Калій гідрофосфат	Merck, кат. № 104873	Концентрація розчину	Реагент субстратного буферу
2.8. Кислота лимонна моногідрат	Sigma-Aldrich кат. № 251275	Концентрація розчину	Реагент субстратного буферу
2.9. Кислота сірчана	Sigma-Aldrich кат. № 68279	Концентрація розчину	Компонент хромової суміші
2.10. Кислота хлоридна	Merck, кат. № 106400	Концентрація розчину	Хімічний реагент
2.11. Мийний засіб «Brillo»	ТУ –У00146137.024-99	Вміст активного хлору 4,86%	Для мийки обладнання, приміщень та робочих поверхонь

Продовження табл. 4.2.

2.12. Мийний засіб «Comet»	ТУ У 64-00480922-42-97	—	Для мийки обладнання, приміщень та робочих поверхонь
2.13. Натрій біхромат	Sigma-Aldrich кат. № 398063	Концентрація розчину	Компонент хромової суміші
2.14. Натрій гідроксид	ЗАТ «Макрохім», ГОСТ 4172-76	Концентрація розчину	Розчин для промивки посуду
2.15. Натрій гідрофосфат	Sigma-Aldrich кат. № S5136	Концентрація розчину	Реагент хроматографічної колонки
2.16. Перекис водню	ТУ 6-224.00556-052-98	Концентрація розчину	Дезінфікуючий розчин
2.17. Сефадекс G-25	Amersham Pharmacia Biotech кат. № 17-0033-01	Концентрація розчину	Реагент хроматографічної колонки
2.18. Спирт етиловий	БАТ ВВП «Укрзооветпромпостач», ТУ 6-09-1710-77	Концентрація розчину	Дезінфікуючий розчин
2.19. Трис-основа	Merck, кат. № 108387	Концентрація розчину	Реагент хроматографічної колонки
2.20. Фенолфталеїн	Sigma, кат. № 105945	Концентрація розчину	Індикатор
3. Матеріали:			
3.1. Бутель на 5, 10, 15, 20 (л)	ГОСТ 23932-79Е	—	—
3.2. Вата медична	ГОСТ 5556-81	—	—
3.3. Етикетка зовнішня (30×20) мм	—	—	—
3.4. Кріоампула	Nunc кат. № 366656	Стерильність	Збереження готового продукту
3.5. Колба мірна	ГОСТ 25336-82Е	Стерильність	—
3.6. Колба Ерленмейєра	ГОСТ 25336-82Е	Стерильність	—
3.7. Комплекти одягу чоловічі та жіночі для чистих приміщень	ТУ У 16293843.007-2000	Стерильність	—
3.8. Кювета для спектрофотометрії, 0,5 мл	Sigma, кат. № S 5178	Стерильність	—
3.9. Лізоформін	Лізоформ	—	Дезінфікуючий розчин
3.10. Марля медична	ГОСТ 16427-93	—	—

Продовження табл. 4.2.

3.11. Мило тверде туалетне	ОСТ 18-336-78	—	—
3.12. Мішалка магнітна	MRCLAB	—	—
3.13. Наконечники: 20-200 мкл	Sarstedt, кат. № 70760 001	Стерильність	—
0-300 мкл	Finntip, № кат.9401250	Стерильність	—
20-1000 мкл	Sarstedt, кат. № 70762	Стерильність	—
3.14. Окуляри захисні	ГОСТ 12.4.013-97	—	—
3.15. Пакети для сміття	—	—	—
3.16. Пакет з поліетиленової плівки	ТУ У 20067704002-99	—	—
3.17. Паличка скляна	ТУ 64.2.235-78	—	—
3.18. Папір індикаторний	Schleicher&Schull кат. № 37040 ТУ 6-09-1181-76	—	—
3.19. Папір канцелярський А-4	Xerox	—	—
3.20. Папір технічний	ГОСТ 1760-86	—	—
3.21. Піпетка автоматична на 2-20 мкл	Ленпіпет	Стерильність	—
3.22. Піпетка автоматична на 20-200 мкл	Ленпіпет	Стерильність	—
3.23. Піпетка автоматична на 50-200 мкл	Ленпіпет	Стерильність	—
3.24. Піпетка автоматична 8-канальна на 0-200 мкл	Ленпіпет	Стерильність	—
3.25. Піпетки серологічні	Nunc кат. № 159609	Стерильність	Відбір речовин
3.26. Планшет 96-лунковий	Nunc кат. № 460984	Стерильність	Культивування гібридом
3.27. Планшет полістироловий з плоским дном для ІФА	Nunc, кат. № 467679	Стерильність	—
3.28 Пробірки імунологічні	Nunc кат. № 443990	Стерильність	Збереження зразків
3.29. Пробірки центрифужні	Nunc кат. № 366036	Стерильність	Процедура осадження
3.30. Пробка гумова	ТУ 38.006108-90	—	—
3.31. Респіратор	ГОСТ 12.4.041-89	—	—

Продовження табл. 4.2.

3.32. Рукавички господарські гумові	—	—	—
3.33. Рукавички хірургічні гумові	ГОСТ 3-88	—	—
3.34. Рушники паперові	—	—	—
3.35. Серветки з безворсової тканини	ГОСТ 16428-89	—	Протирання поверхонь
3.36. Тканина капронова технічна	ТУ 17-04-08-468-96	—	Протирання поверхонь
3.37. Ферментер половолоконний	FiberSell System	—	—
3.38. Фільтр грубої очистки РВ1	Sartoclear	—	Для фільтрації біологічних розчинів
3.39. Фільтр з активованим вугіллям, СС-10	USFilter	—	Для підготовки води
3.40. Фільтр поліпропіленовий, R30 (R20)	USFilter	—	Для підготовки води
3.41. Фільтр тонкої очистки Sartopore 2 XLG	Sartopore	—	Для фільтрації біологічних розчинів
3.42. Флакон пластиковий 25 см ²	Nunc кат. № 156367	Стерильність	—
3.43. Флакон пластиковий 75 см ²	Nunc кат. № 156499	Стерильність	—
3.44. Халат медичний жіночий	ГОСТ 24760-81	—	Спец. одяг
3.45. Халат медичний чоловічий	ГОСТ 25194-62	—	Спец. одяг
3.46. Центрифуга	Beckman	—	—
3.47. Циліндр мірний на 0.01, 0.25, 0.5, 1, 2 (л)	ГОСТ 25336-82Е	Стерильність	—
3.48. Чашка Петрі	ГОСТ 25336-82Е	Стерильність	—
3.49. Шапочка бавовняна	ГОСТ 23134-78	—	Спец. одяг
3.50. Шпагат технічний	ГОСТ 15266-70	—	—

4.3 Опис технологічного процесу

ДР1. Санітарна підготовка.

Основним спрямуванням санітарної підготовки виробництва є мінімізація кількості контамінантів у складі ділянок виробничого процесу. Санітарна підготовка виробництва здійснюється відповідно до настанови «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» затвердженої Наказом Міністерства охорони здоров'я України та містить в себе ряд заходів, які направлені на:

- 1) забезпечення необхідної якості продукту, що виробляється на всіх етапах;
- 2) попередження їх забрудненості в процесі виробництва, зберігання та транспортування;
- 3) створення безпечних умов праці та охорони здоров'я зайнятого персоналу.

Для забезпечення необхідного рівня санітарного стану виробництва проводиться комплекс робіт з підготовки вентиляційного повітря, виробничих приміщень та обладнання, належного технологічного одягу, навчання персоналу основам роботи, приготування дезінфекційних розчинів.

Будь-які операції технологічного циклу виробництва здійснюють у виробничих приміщеннях з «виробничим класом чистоти» з використанням вентиляційної системи триступеневого очищення повітря [54, 55].

ДР 1.1. Підготовка технологічного одягу.

Підготовку технологічного одягу здійснюють відповідно до настанови МОЗ «Лікарські засоби. Належна виробнича практика». Технологічний одяг, що використовується персоналом, який працює у виробничих приміщеннях виробничого класу чистоти та не має контакту з потенційно інфекційними матеріалами, два рази на місяці передаються на пральний комбінат. Після прання чисті комплекти технологічного одягу пакуються в пакети, на які наклеюються стандартні етикетки с позначенням статусу, і передаються у санпропускник виробничої зони виробничого класу чистоти. Перед пранням проводиться огляд

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		69

технологічного одягу, проводиться оцінка ступеня зносу та виявлення ушкоджень. При наявності дефектів одяг ремонтується або замінюється на новий.

Технологічний одяг, що використовується персоналом, який працює у боксах і має контакт з потенційно інфекційними матеріалами двічі на місяці дезінфікується автоклавуванням (тиск – 2 атм, 30 хв), після чого передається на прання. Такі комплекти технологічного одягу використовуються тільки для роботи у боксах. Виходячи за межі боксів, персонал одягає інший комплект технологічного одягу [54, 55].

ДР 1.2. Підготовка персоналу до роботи.

Складовою частиною санітарної підготовки є підготовка персоналу, як можливого джерела контамінації, при цьому персонал проходить навчання та контроль знань стосовно особливостей технологічного процесу. Основою підготовки персоналу є навчання тому як забезпечити біобезпеку при роботі з біологічними агентами. Підготовку персоналу до роботи здійснюють відповідно до настанови «Лікарські засоби. Належна виробнича практика».

Перед входом у виробничу зону, персонал знімає верхній одяг та змінює вуличне взуття на перехідне, в якому входить у перше приміщення санпропускника. У першому приміщенні санпропускника, персонал знімає будь-які предмети одягу та перехідне взуття, залишаючись у спідній білизні. Після чого, у відведеному санітарному вузлі, персонал приймає душ (за необхідності), миє та обробляє дезінфекційними розчинами руки згідно з настановою МОЗ «Лікарські засоби. Належна виробнича практика». Після дезінфекції, одягають халат та шапочку (косинку) у другому відділенні приміщення санпропускника. Для осіб, які працюють у приміщеннях виробничого класу чистоти, цей комплект одягу є технологічним. Персонал, що працює у приміщеннях виробничого класу чистоти, проходить безпосередньо у виробничу зону через друге відділення санпропускника. Персонал, що працює у ламінарних боксах з

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		70

підвищеним рівнем чистоти, при вході в бокс переодягається в комплект одягу для боксів, який зберігається окремо [54, 55].

ДР 1.3. Приготування дезінфекційних розчинів.

Приготування дезінфекційних розчинів, які призначені для обробки приладів та приміщень, здійснюють відповідно до настанови МОЗ «Лікарські засоби. Належна виробнича практика». Приготування відповідних розчинів здійснюють, дотримуючись засобів особистої безпеки: одягають гумові рукавички, захисні окуляри, марлеву пов'язку. Розраховану кількість дезінфекційного розчину зважують на терезах або відміряють за допомогою мірної склянки, після чого розчиняють або розводять деіонізованою водою до потрібного об'єму. Розчини перекису водню готують в чистому посуді шляхом додавання до води спочатку перекису водню, а потім мийного засобу. У якості мийного засобу використовують рідкі мийні засоби типу «Brillo» та «Comet». Термін зберігання приготованих розчинів 5-6 днів. Для обробки рук персоналу використовують готовий комерційний препарат «Sterillium». Використання вказаних розчинів дозволяє об'єднати процеси дезінфекції та миття при санітарній обробці виробничих приміщень та обладнання.

ДР 1.3.1. Приготування 76 % розчину спирту.

Для отримання розчину, змішують воду питну та 96 % етиловий спирт у співвідношенні 1: 3,3 у збірнику з перемішувальним пристроєм (при 40 об/хв). Зберігають у спеціальній ємності (збірнику) протягом визначеного часу.

ДР 1.3.2. Приготування розчину перекису водню.

Розчин готують шляхом розведення 33 % розчину перекису водню водою питною у збірнику з перемішувальним пристроєм при 40 об/хв до утворення 1-3 % розчину, після чого даний дезінфекційний розчин зберігають у спеціальній ємності (збірнику) протягом визначеного часу. Розчин перекису водню

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		71

використовується у поєднанні з розчином мийного засобу для обробки виробничих приміщень та обладнання [54, 55].

ДР 1.4 Підготовка виробничих приміщень.

Підготовку виробничих приміщень здійснюють відповідно до настанови МОЗ «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» [55].

Приміщення виробничого класу чистоти обробляються мийними, дезінфекційними та мийно-дезінфекційними засобами для зниження рівня загального забруднення та мікробної контамінації. Щоденне прибирання включає протирання дверей, дверних ручок, підвіконня та дрібних предметів розчином 1 % перекису водню та 0,5 % мийного засобу (МЗ). Таким самим розчином миють підлогу з розрахунку 100 мл/м² поверхні підлоги. Перед початком робіт персонал виробничих приміщень протирає поверхні столів та дрібне обладнання 76 % етиловим спиртом. Раз на тиждень повторюють такі ж операції, використовуючи розчин 1 % перекису водню та 0,5 % МЗ.

Генеральне прибирання приміщень проводять один раз на місяць. Робочі поверхні та невелике за розміром обладнання протирають 76 % розчином етилового спирту. Двері й інші поверхні обробляють поролоновою губкою, яка змочена в 3 % розчині перекису водню з 0,5 % МЗ з розрахунку 100 мл/м² поверхні. Цим же розчином миють підлогу [54, 55].

ДР 1.5. Підготовка технологічного обладнання.

Підготовку технологічного обладнання здійснюють відповідно до настанови МОЗ «Лікарські засоби. Належна виробнича практика». Підготовка технологічного обладнання це багатостадійна обробка, що включає – миття, дезінфекцію, ополіскування та стерилізацію окремих частин (вузлів) обладнання або у випадку неможливості розбирання – обробку внутрішніх та зовнішніх частин (поверхні) мийними та дезінфекційними розчинами та регламентується відповідними розділами технологічних інструкцій та інструкцій з експлуатації обладнання [54, 55].

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		72

ДР 1.5.1. Дезінфекція обладнання та інвентарю.

Для процедури використовують поролонові губки, серветки з зачепленими краями з безворсової тканини, у якості мийного засобу застосовують засіб «Brillo», а в якості дезінфекційних засобів – розчини перекису водню та етилового спирту. Матеріали та інвентар після використання знезаражують замочуванням на 2-3 години в 6 % розчині перекису водню.

Частини (вузли) обладнання, які безпосередньо торкаються з сировиною або її проміжними продуктами, знімають, розбирають і старанно миють деіонізованою водою, протирають (або промивають) 30% або 76% етиловим спиртом. Таким же чином оброблюють внутрішні частини обладнання та зовнішні металічні поверхні.

ДР 1.5.2. Стерилізація фільтрів.

Стерилізацію фільтрів грубого очищення проводять автоклавуванням за температури 121°C, тиску 10 кПа упродовж 30 хв. Для фільтрів тонкого очищення умови стерилізації інші – температура 134°C, тиск 20 кПа упродовж 30 хв [54, 55].

ДР 1.6. Підготовка та контроль технологічного повітря.

Підготовку вентиляційного повітря здійснюють відповідно до настанови МОЗ «Лікарські засоби. Належна виробнича практика». Виробничі приміщення оснащено системою вентиляції повітря, яка забезпечує підтримку в них потрібних мікрокліматичних умов (вологість, температура) та чистоти повітря. У даній системі вентиляції застосовують 3-ступеневе очищення повітря з використанням фільтрів грубого та тонкого очищення. Для забезпечення мікрокліматичних показників вентиляційного повітря використовують кондиціонери.

Основним способом визначення мікробної контамінації повітря є седиментаційний аналіз Коха. У визначених місцях приміщення розміщують чашки Петрі з розлитим стерильним поживним середовищем. По закінченню

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		73

часу експозиції, чашки Петрі інкубують в термостаті, після чого роблять підрахунок колоній [54, 55].

ДР2. Підготовка посуду та хімічних реагентів.

Важливим етапом є підготовка необхідного посуду та реagentів для роботи. Специфіка технології вимагає застосування лише високоякісних, стерильних матеріалів.

ДР 2.1. Приготування деіонізованої води.

Приготування деіонізованої води здійснюють згідно з виробничою інструкцією *ВІ-09/13-1* [5]. Деіонізована вода, що використовується на підприємстві, одержують за допомогою пристрою «Milli RX-20» або «EPRO-450». Контроль ступеню деіонізації води виконують в автоматичному режим за допомогою датчика питомого опору. Контроль здійснюють працівники дільниці. Показник питомого опору деіонізованої води демонструється на індикаторному табло та повинен становити від 10 до 15 МОм. Деіонізовану воду одержують з потреби для всіх стадій виробничого процесу та збирають у відповідний збірник.

Деіонізована вода, використовується безпосередньо з біологічним агентом або як реагент специфічних реакцій, повинна бути використана не пізніше 18 годин з моменту отримання, для решти виробничих процесів, термін зберігання складає не більше 3 діб. Термін та умови зберігання деіонізованої води регламентується відповідними розділами технологічних інструкцій. Дата отримання деіонізованої води реєструється в *Ф-09/4-2* «Карті обліку заказів і отримання деіонізованої води для виробничих цілей» [54, 55].

ДР 2.2. Приготування води очищеної.

Приготування води очищеної включає декілька етапів фільтрування на фільтрах попереднього та тонкого очищення.

Питна вода за допомогою відцентрового насоса поступає на фільтр попереднього очищення. Активоване вугілля, наповнювальний матеріал фільтра,

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		74

затримує молекули активного хлору та підлягає щоквартальному контролю на вміст хлору. Фільтр працює без регенерації та промивки. Щоденно необхідно проводити контроль перепаду тиску до і після фільтрування. Наступний етап очищення базується на проходженні води через одноразовий трубчастий фільтр з поліпропіленових волокон для знесолення. Використані фільтри не підлягають відновленню. Питома електропровідність води очищеної складає не більше 4,3 мСм/см. Після трубчастого фільтра, вода подається через патронний фільтр до збірника, із якого потім центробіжним насосом подається до магістралі [54, 55].

ДР 2.3. Підготовка посуду.

Роботи з культивування вимагають суворого дотримання стерильності; до експерименту допускається тільки бездоганно чистий посуд. Приготування посуду здійснюють згідно з робочою інструкцією *PI-09/10* [55].

Здача скляного та великого пластикового посуду на мийку здійснюється в спеціально промаркованих ємностях (відрах, тазях), на яких вказано назву ділянки та номер робочого приміщення. Пластикові ампули та наконечники здають на мийку в 1-3 літрових банках, замоченими в 0,1N NaOH (в окремих банках). Кожна банка повинна бути промаркована як вказано вище.

При здачі забрудненого посуду на мийку, працівник, що здає посуд робить відповідний запис в технологічній карті «Підготовка посуду» (*TK-09/10-1*), вказуючи прізвище та підпис працівника, що здав посуд, дата здачі, перелік посуду по групах з відповідним способом мийки. Чистий посуд сушать в окремих маркованих металевих сітках (для скляного посуду) або в стаканах (наконечники, ампули). Ємності з чистим посудом видаються за необхідності під розпис, відповідно до *TK-09/10-1* [55].

Для миття посуду використовують мийний засіб «Brillo» в концентрації 0,5%. Для приготування робочого розчину до 10 л теплої водопровідної води додають 50 мл концентрованого розчину, перемішуючи вміст.

Іншим мийним засобом є хромова суміш (ХС). Для приготування ХС 30 г подрібненого біхромату калію ($K_2Cr_2O_7$) або біхромату натрію ($Na_2Cr_2O_7$)

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
						75
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		

розчиняють в 1 л концентрованої сірчаної кислоти (H_2SO_4). Суміш зберігають в скляному посуді, закритому притертою пробкою.

Роботу з ХС та з концентрованою сірчаною кислотою проводять в спецодязі (гумові фартух і рукавички, захисні окуляри) суворо дотримуючись правил безпеки, які наведені в інструкції «Правила безпеки при роботі з кислотами та лугами».

Підготовка посуду кваліфікації «чисто» на виробництві вводяться наступні способи миття посуду:

Спосіб миття для підготовки забрудненого скляного та пластикового посуду, що не мав контакту з білками, сироватками й іншими біологічними компонентами (наприклад, посуд з-під буферних розчинів).

- замочування на 0,5-1 години в гарячому 1 % розчині МЗ;
- ополіскування 12 разів проточною теплою водопровідною водою і 3 рази деіонізованою водою;
- сушка при 140-180°C.

Спосіб для мийки брудного скляного та пластикового посуду, що мав контакт із білками, сироватками й іншими біологічними компонентами (у тому числі посуд та інструменти після знезаражування дезрозчином).

- замочування на 7-8 год у гарячому 1 % розчині МЗ;
- ополіскування 12 разів проточною теплою водопровідною водою і 3 рази деіонізованою водою;
- сушка при 140-180 °C.

Скляний посуд миють 0,5 % розчином МЗ, промивають теплою водопровідною водою і тричі ополіскують деіонізованою водою. Бутлі, колби та пробірки закривають ватно-марлевими пробками. Чашки Петрі загортають у папір по 5 штук і обв'язують шпагатом. Піпетки закривають ватними тампонами та загортають по одній в папір або поміщають в скляні пенали по 20-30 штук, які закриваються ватно-марлевими пробками або фольгою. Посуд стерилізують в сушильних шафах при температурі 160-200°C протягом 2 годин.

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		76

Експлуатацію автоклава проводять згідно з інструкцією, дотримуючись викладених в ній правил безпеки.

Підготовку посуду кваліфікації «хімічно чиста» проводять наступним чином: попередньо вимитий мийним засобом і висушений посуд поміщають в посудину та заливають хромовою сумішшю на 1-2 години, після чого хромову суміш зливають у вихідну посудину. Залишки ХС на стінках посуду видаляють ополіскуючи концентрованою сірчаною кислотою. Посуд, оброблений ХС ретельно промивають теплою проточною водою, ополіскуючи 4-5 разів деіонізованою водою. Вимитий посуд розміщують на підставках для стікання залишків води, після чого кладуть у сушильну шафу за температури 160-200°C на 2 години. Після охолодження, чистий посуд зберігають у поліетиленових пакунках. Ступінь чистоти посуду «чисто» або «хімічно-чисто» для кожної технологічної операції визначена у виробничих інструкціях [54, 55].

ДР 2.4 Приготування реагентів.

- Приготування сульфату амонію:

Насичений сульфат амонію готують, змішуючи 1 кг кристалічного сульфату амонію з 1 л дистильованої води та перемішуючи протягом 1-2 днів. Щоб бути впевненим у насиченні, на дні посудини повинні бути нерозчинені кристали. рН розчину в межах 6-7, перевіряють індикаторним папірцем. Зберігають стерильно при 4°C [46].

- Приготування субстратного буфера у розрахунку на 1 л:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	24,25 г;
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	24,25 г;
Лимонна кислота	до 50 г;
Перекис водню (35 %)	15,7 мл;
Вода деіонізована	до 1 л.

У чистий скляний бутель-мірник наливають деіонізовану воду, засипають при перемішуванні наважку калій- та натрій гідрофосфату. Перемішують до повного розчинення. Таким же чином окремо готують розчин лимонної кислоти.

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		77

У розчин фосфату вливають при перемішуванні розчин лимонної кислоти до рН 4,5-4,7. Об'єм доводять до потрібного деіонізованою водою. У разі відхилення рН від зазначеного діапазону, доводять 20% розчином NaOH (або 5N HCl).

- Приготування розчину для кріоконсервації, (г/л):

Азид натрію	50 г;
Паранітрофенол	5 г;
Вода очищена	до 1 л.

Приготування розчину проводять згідно з виробничою інструкцією *ВІ-09/05-6*. Наважки азиду натрію, паранітрофенолу розчиняють в очищеній воді. Розчин зберігають при кімнатній температурі до повного використання [54, 55].

ДР 2.4.1. Приготування стерильних поживних середовищ.

Приготування стерильних поживних середовищ здійснюють згідно з виробничою інструкцією *ВІ-09/01-1* та *ВІ-09/01-2*. Середовища випускаються у вигляді готових розчинів, 10-кратних концентратів і сухих порошків. Найбільш точні результати виходять при приготуванні середовищ в умовах лабораторії з сухих порошків, однак при цьому важливе значення має якість води, вона має бути деіонізована та два або три рази пройти процес дистиляції [54, 55].

- Склад поживного середовища для седиментаційного аналізу чистоти повітря (г/л):

Дріжджовий екстракт	5 г;
Бактотриптон	10 г;
Глюкоза	2 г;
NaCl	5 г;
Агар-агар	15 г;
Вода деіонізована	до 1 л

У колбу ємністю 3 л висипають зважені компоненти і заливають 0,5 л деіонізованої води. Ретельно перемішують вміст колби до повного розчинення

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		78

компонентів. Доливають у колбу 1,3 л деіонізованої води. Вміст колби ретельно перемішують. Після цього поживне середовище розливають порівно у 2 термостійкі колби об'ємом 2 л і закривають ватно-марлевими пробками. Після автоклавування, середовище розливають в чашки Петрі по 20 мл (у кількості 90 шт.)

- Склад поживного середовища DMEM (Complete Dulbecco's Modified Eagles Media):

Глюкоза – 4,5 г/л;

Натрій бікарбонат – 3,7 г/л;

Фосфатно-сольовий буфер – 100 мл/л;

Пеніцилін-стрептоміциновий розчин – 10 мл/л;

L-глутамін – 0,2 г/л;

Фенолфталеїн – 0,0053 г/л.

- Склад поживного середовища RPMI-1640:

Глюкоза – 4,5 г/л;

Натрій бікарбонат – 2 г/л;

Пеніцилін-стрептоміциновий розчин – 6 мл/л;

HEPES - буфер – 3,5745 г/л;

L-глутамін – 0,3 г/л;

2-меркаптоетанол – 0,36 мл/л

Фенолфталеїн – 0,0053 г/л.

Середовища готують на деіонізованій воді. Розчини фільтрують на установці з розміром пор мембрани 0,2 мікрметра. Розливають на аліквоти 500-1000 мл та зберігають при 2-8°C упродовж 6 тижнів.

ТПЗ. Відтворення музейної культури.

Кріоампули з замороженими клітинами клонів, витримують на повітрі 2-3 хвилини та занурюють у водяну баню із температурою 37-40°C, при цьому легко струшуючи. Пробірки витримують у воді до тих пір, поки повністю розтане лід.

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		79

Після цього, за допомогою піпетки переносять суспензію гібридом в імунологічні пробірки на 15 мл, повільно додаючи 10-15 мл теплового середовища DMEM без сироватки [52].

ТП 3.1 Цетрифугування.

Суспензію центрифугують при 1300 об/хв, протягом 3 хв. Видаляють надосадову рідину, а осад клітин ресуспендують у 10 мл теплового середовища DMEM [52].

ТП 3.2 Інкубація культури.

Суспензію переносять у флакон для культивування з площею росту 25 см², що містить безсироваткове поживне середовище DMEM з додаванням L-глутаміну та глюкози. Флакон поміщають у CO₂-термостат у якому автоматично підтримуються стала вологість до 95%, температура на рівні 37°C та концентрація вуглекислого газу до 5%.

ТП 3.3 Скринінг життєздатності клітин.

Життєздатність відновлених клітин становить 50-78%. На стадії інкубації відновленої культури, необхідно перевіряти вміст специфічних антитіл в культуральній рідині за допомогою певного набору контрольних антигенів. Визначення проводять, виявляючи антиген-антитіло зв'язувальну властивість за тестом ELISA.

Сорбують антиген у лунках планшету, розбавляючи антиген у сольовому розчині, забуференому ФСБ, що містить 0,02% NaN₃ (5-10 мкг/мл) і дозують 50 мкл у кожну лунку 96-лункового планшета. Розлиті планшети інкубують протягом ночі при 4°C або 2-3 год при 37°C. Залишки антигену змивають розчином ФСБ, після чого додають 50 мкл блокуючого буфера (5% розчин ЕТС, та 0,02% NaN₃). Планшет інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі, після чого у лунки до розчину антигену вносять 50 мкл супернатанту та повторно інкубують за тих же умов. Для позитивного контролю

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		80

у певну лунку додають 50 мкл серійно розведених позитивних сироваток від гіперімунізованих мишей. Лунки чотири рази промивають сольовим розчином (0,15 М NaCl), після чого вносять 50 мкл ФСБ Дюльбека (ФСБД), що містить у складі фенолфталеїн. Планшет інкубують при кімнатній температурі протягом 15 хв з повторним внесенням 50 мкл ФСБД та залишають на 5-10 хв при кімнатній температурі. Для зупинки реакції вносять 50 мкл 0,3 М сульфатної кислоти. Оскільки ступінь гідролізу субстрату пропорційна кількості антитіл у супернатантах гібридом, позитивну реакцію можна візуально оцінити неозброєним оком за зміною кольору індикатору. Для кількісної перевірки, визначають оптичну густину культуральної рідини за довжини хвилі 490 нм [11, 56].

ТП 3.4. Підготовка інокулята.

Після 3-4 днів інкубування, у флаконі помітно збільшується кількість культури, тому весь вміст культуральної рідини переносять у флакон з ростовою площею 75 см². Накопичення інокуляту проводять у колбах Ерленмеєра місткістю 500 мл, об'єм заповнення поживного середовища 200 мл на колбу. Клітини засівають в концентрації $4,5 \cdot 10^5$ клітин/мл, культивують без заміни середовища до досягнення щільності $3 \cdot 10^6$ клітин/мл (4-5 днів), після чого, протягом трьох днів, щоденно додають 4 мМ L-глутаміну і 3 мМ глюкози [11, 57].

ТП4. Масове напрацювання МкАТ.

Для успішної роботи з отримання культури гібридом, експеримент бажано проводити в окремому приміщенні, максимально віддаленому від дверей та зовнішніх стін. Необхідним для проведення роботи лабораторним обладнанням є ламінарний бокс з вертикальною чи горизонтальною подачею стерильного повітря.

Напрацювання антитіл здійснюється у половолоконних системах біореактору мембранного типу фірми FiberSell System з використанням

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		81

безсироваткового поживного середовища DMEM. У картриджі міститься пучок волокон із напівпроникної мембрани, через які клітини живляться та здійснюють газообмін. Завдяки адгезії, клітини прикріплюються на зовнішній поверхні мембрани. Такий тип біореактору дозволяє отримати досить велику щільність і концентрацію клітин в культуральній рідині, в ньому практично відсутня ймовірність механічного пошкодження клітин, що є важливою умовою росту тваринних клітин. Характеристики культивування наведені в таблиці 4.3.1 [58].

Таблиця 4.3. Параметри культивування продуцента[58].

Параметри культивування	Значення
Температура	37°C
pH	7,3
pO ₂	30%
Витрата CO ₂	0,06 л/год
Витрата O ₂	0,06 л/год
Витрата поживного середовища	12 л/год
Час культивування	8 діб
Кількість клітин	6-7·10 ⁷

Половолоконной мембранний біореактор міститься всередині термошафи, оснащеної датчиком температури та контролером біопроектів. Контролер служить для автоматичної підтримки основних технологічних параметрів, які зображуються на дисплеї. У контролері за допомогою програми формуються сигнали управління, які разом з виконавчими механізмами управляють процесом терморегулювання, швидкостями обертання перемішувальних пристроїв, включенням / виключенням насосів.

ТП 4.1. Гомогенізація та підтримка термодинамічних показників ПС

Подача поживного середовища у внутрішньоволоконний і міжволоконний простори біореактора здійснюється за допомогою перестальчасного насоса зі змінною швидкістю по силіконовим шлангам. У верхній штуцер картриджу подається свіже поживне середовище, після проходження всієї довжини

мембранного волокна, видаляється через нижній штуцер, після чого насосом перекачується у збірник, де підігрівається до необхідної температури та гомогенізується мішалкою. Відновлене, таким чином, середовище знову подається у біореактор. Застосування перфузійного типу живлення забезпечує як високі ростові показники продуцента, так і значно зменшує об'єми поживного середовища, що застосовується в процесі.

Для підтримки необхідного рівня рН і концентрації кисню в поживному середовищі до термошафи підводиться газова суміш з CO_2 і O_2 через відповідний штуцер.

Час культивування складає 8 діб, саме це оптимальний період, коли клітини досягають ростового та синтезувального піків, розрахований на основі біохімічних показників клітин продуцента (див. пункт 5.2.2). При довшому терміні культивування, збільшується щільність продуцента, що призводить до контактної інгібіції клітин, і як наслідок зменшенню титра антитіл у культуральній рідині.

На 6-7 добі культивування, відбирають зразки культуральної рідини для визначення концентрації антитіл методом оптичної густини. Осаджений супернатант іншого зразку тестують на антигензв'язуючу властивість антитіл.

ТП5. Виділення антитіл.

Після закінчення культиваційного циклу, культуральну рідину зливають з картриджа через шланг в окрему стерильну ємність для подальших процесів очищення.

ТП 5.1 Центрифугування культуральної рідини

Отриману на попередніх етапах культуральну рідину охолоджують та центрифугують при 4000 об/хв упродовж 20 хв за температурного діапазону в 0-4°C в центрифугі *Beckman* з охолоджувальним пристроєм. Надосадову рідину старанно видаляють, осад суспендують у мінімальній кількості (1-2 мл) холодної деіонізованої води [52].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		83

ТП 5.2 Фільтрація супернатанту

Суспензію антитіл фільтрують двома етапами. Перший, полягає у видаленні крупних часток за допомогою фільтру *Sartoclear PB1* при 20 кПа, розмір пор мембрани 11-4 мкм. Другий етап – стерилізуюча фільтрація з використанням фільтра широкої хімічної сумісності *Sartopore 2 XLG* при 40 кПа з розміром пор мембрани 0,8-0,2 мкм. Відфільтрований розчин зберігають при температурі 0-4°C.

ТП 5.3 Концентрування розчину МкАТ.

Концентрування здійснюють за допомогою осадження білкових структур насиченим розчином сульфату амонію, охолодженого до 4°C з рН 6-7. Для цього, охолоджений препарат МКАТ поміщають на магнітну мішалку з невеликою кількістю обертів, задля запобігання утворенню піни, що денатурує білок. У розчин, по краплях додають насичений розчин сульфату амонію до 40-50 % насичення та розмішують суміш упродовж 30 хв. Застосування більш високих концентрацій не є ефективним та не збільшують вихід імуноглобулінів, але здатні посилювати білкову контамінацію іншими білками, зокрема альбуміном [46, 52].

ТП 5.4 Центрифугування концентрату МкАТ.

Концентрат антитіл центрифугують в центрифугі *Beckman* при 0-4°C, 2000 об/хв, 5 хв [52].

ТП 5.5 Фільтрація розчину МкАТ.

Осад на дні пробірки суспендують у 1-2мл холодної деіонізованої води та повторно фільтрують на апараті *Sartopore 2 XLG* з порами 0,8-0,2 мкм.

ТП6. Очистка антитіл.

Очистку проводять за допомогою афінної хроматографічної колонки з білком А-сефарозою. Для афінного очищення використовують колонку зв'язану

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		84

з білком об'ємом 10мл. Перед нанесенням зразку МкАТ, колонку промивають зі швидкістю 1,5-2 мл/хв 5-10 об'ємами 0,02М натрій-калій фосфатного буфера, рН 7,0-7,2 (KH_2PO_4 та Na_2HPO_4). Відфільтровану рідину пропускають через колонку зі швидкістю 1 мл/хв. Після цього промивають колонку 10-15 об'ємами фосфатного буфера. Елювання проводять за допомогою 0,1М лимонної кислоти в об'ємі 15 мл. Вихід МкАТ реєструють при 280 нм. Продукт, який виходить із колонки збирають у флакон, що містить 2мл 1М трис-основи. рН одержаного розчину перевіряють за допомогою індикаторного паперу та має бути на рівні 7,0-8,0. При відхиленнях значення рН, вміст коректують, додаючи кислоту або трис-основу. Після виходу піку продукту, колонку промивають зі швидкістю 1,5-2 мл/хв 10-20 об'ємами 0,02М натрій-калій фосфатного буфера до нейтрального показника рН. Концентрація, одержаних таким способом МкАТ, коливається від 20 до 40 мг/мл [52].

Переведення МкАТ у буферний розчин здійснюють шляхом гел'я фільтрації, використовуючи хроматографічну колонку з сефадоксом. Стандартний фосфатний буфер (рН 7,2-7,4) фільтрують через фільтр тонкого очищення *Sartopore 2 XLG*. Використовують колонку 1,5 x 20 см з сефадексом G-25, зрівноважену фосфатним буфером шляхом пропускання його із швидкістю 2 мл/хв упродовж 20 хв. Розчин моноклональних антитіл в об'ємі 2-3 мл наносять на гел'я, після поглинання розчину гелем наносять такий же об'єм буферу. Після поглинання гелем буферу, колонку заповнюють фосфатним буфером доверху, вставляють адаптер та проводять елюцію фосфатним буфером зі швидкістю 2 мл/хв [52].

ПМВ7. Розлив МкАТ.

До одержаної фракції МкАТ у фосфатно-сольовому розчині додають 1% 0,09% розчину азиду натрію та проводять розлив у кріоампули, за допомогою спеціальної установки. На ампулі міститься зовнішня етикетка із зазначення необхідної інформації. Для збереження готового продукту, ампули поміщають у поліпропіленові підставки та зберігають при 4°C при короткому або при -20°C

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		85

при тривалому терміні зберігання. За необхідності, продукт кріоконсервують при -70°C у посудині Дюара з рідким азотом. При транспортуванні ампули поміщаються у термоконтейнери з холодоелементами, для запобігання розмороження вмісту ампули [52].

ЗВ8. Знешкодження відходів.

Речовини, що знешкоджуються на виробництві це: тверді та рідкі відходи після проведення контрольних аналізів зі стадії ДР1 (контроль мікробної контамінації повітря, приміщень, обладнання, технологічного одягу та рук персоналу чистих приміщень), а також поживних середовищ після культивування культури гібридами на стадії ТП 3.2 та ТП 4; відпрацьована хромово суміш зі стадії ДР 2.

Рідкі відходи, що не містять токсичних компонентів (або містять у надмалих дозах) не підлягають спеціальним операціям знешкодження. Перед зливом у міську каналізацію їх розводять значною кількістю водопровідної води для досягнення ГДК. Тверді нешкідливі відходи, що надходять зі всіх стадій виробництва, підлягають утилізації. Утилізація відходів проводиться згідно з виробничими методиками підприємства та ДСТУ ISO 14004-97 Системи управління навколишнім середовищем. Загальні настанови щодо принципів управління, систем та засобів забезпечення; ДСТУ 2195-99 Охорона природи. Поводження з відходами. Технічний паспорт відходу. Склад, вміст, виклад і правила внесення змін [54].

ЗВ 8.1 Знешкодження відходів відпрацьованих поживних середовищ.

Рідкі відходи (фугат культуральної рідини) після збору біомаси центрифугуванням на ТП 5 зливають в бутель об'ємом 20 л і стерилізують в автоклаві при $(1,0 \pm 0,05)$ атм протягом 40 хвилин, після чого охолоджують до $20-30^{\circ}\text{C}$ і зливають в каналізацію. Чашки Петрі з відпрацьованими агаризованими середовищами з ДР1 поміщають в металевий бокс і стерилізують в автоклаві за згаданих вище умовах [54].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		86

ЗВ 8.2 Нейтралізація кислотних і лужних стоків.

Відпрацьовану хромову суміш зі стадії ДР2 нейтралізують гідроокисом натрію до рН 6-7 (контролюють паперовим рН-індикатором), потім порціями зливають в каналізацію під проточною водою [54].

ЗВ 8.3 Знешкодження потенційно інфекційних відходів.

З метою забезпечення повної протиепідемічної безпеки усі рідкі та тверді відходи на певних стадіях вважаються потенційно інфекційними та підлягають повному знешкодженню:

- Тверді відходи (планшети, вата, фільтри, рукавички, наконечники для піпеток та ін.) – складають у спеціальні марковані бокси та передають на ділянку інактивації відходів, де вони підлягають автоклавуванню при надлишковому тиску $P_{\text{надл}} = 0,1$ мПа протягом 60 хвилин. Після знешкодження тверді відходи направляються на завод «Енергія» для спалення.

- Рідкі відходи зливають у спеціальні марковані ємності з кришками, що містять 1/3 об'єму 2% розчину лізоформіну, та витримують не менше 2 годин. Загальний об'єм відходів, що зливаються у ємність, не повинен перевищувати 1/3 об'єму ємності. Заповнену ємність переносять у спеціально відведене приміщення, де відходи підлягають додатковій обробці хлорним вапном. Для цього суміш відходів з лізоформіном зливають у металеву ємність та засипають хлорним вапном у співвідношенні 5:1, перемішують спеціальною лопатою та витримують не менше 2 годин. Після заповнення ємності на 2/3 об'єму, її герметично закривають кришкою та спецтранспортом вивозять на спалення у міський крематорій.

Порядок організації та проведення знешкодження потенційно інфекційних твердих та рідких відходів визначено в інструкції з санепідемічного режиму, робочих інструкціях підприємства та відповідних договорах з міським крематорієм та заводом «Енергія» [54].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		87

ЗВ 8.4 Розбавлення та злив нетоксичних та малотоксичних відходів розчинів.

Залишки розчинів зі стадій ДР 1.5.1, ДР 2.3 та змиви при мийці обладнання, що не містять токсичних речовин (або містять у надмалих концентраціях) розводять водопровідною водою у 500 – 1000 разів у скляних бутлях об'ємом 20л перед зливом у міську каналізацію [54].

ЗВ 8.5 Утилізація нешкідливих твердих відходів.

Тверді нешкідливі відходи зі всіх стадій виробництва (папір технічний, папір А4, фільтри та ін.) збирають у поліетиленові мішки та спецтранспортом вивозять на міське звалище, якщо вони не підлягають перероблюванню. Паперові та пластикові відходи направляють у пункти приймання вторинної сировини [54].

4.4 Матеріальний баланс

Таблиця 4.4. Матеріальний баланс виробництва.

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
ДР1	А. Напівпродукти:				ДР1	Відходи			
	Поживне середовище					1. Стоки, до складу яких входять:			
	Б. Допоміжні речовини:					Поживне середовище			
	Вода водопровідна					Вода водопровідна			
	Перекис водню 50 %					Перекис водню 50%			
	Спирт етиловий 96%					Засіб «Comet»			
	В. Матеріали					Мило туалетне			
	Антисептичний засіб «Sterillium»					Мийний засіб «Brillo»			
	Бата медична					2. Інші відходи			
	Засіб «Comet»					Антисептичний засіб «Sterillium»			
	Мило туалетне					Бата медична			

Продовження Табл. 4.4.

ДР1	Мийний засіб «Brillo»	1,55			ДР1	Рукавички госп.		6	
	Рукавички госп.		6			Рукавички хірургічні		30	
	Рукавички хірургічні		30			Рушник паперовий		20	
	Рушник паперовий		20			Сміттєві пакети		50	
	Сміттєві пакети		50			Спирт етиловий 96%			5,4
	Чашки Петрі		90			Чашки Петрі		90	
Всього:		1417,39			Всього:		1417,39		
ДР2	А. Діючі речовини				ДР2	А. Напівпродукти:			
	2-меркаптоетанол			0,003 6		Вода деіонізована			40
	Нерес-буфер	0,036				Вода очищена (для всіх стадій виробництва)			100
	L-глутамін	0,055				Поживне середовища DMEM			250
	Агар-агар	0,3				Поживне середовище RPMI-1640			10
	Амоній сульфат	3				Поживне середовище з агаром			4
	Глюкоза	1,2				1. Відходи, до складу яких входять:			
	Дріжджовий екстракт	0,01				Відпрацьована хромово суміш			3
	Ембріональна теляча сироватка	0,002				Мило туалетне		2	
	Калій бікарбонат	0,075				Миючий засіб «Brillo»	2,75		
	Калій гідрофосфат	0,12				Натрій гідроксид			0,15
	Кислота лимонна	0,08				Перекис водню, 50 %			0,74
	Натрій бікарбонат	7,9				2. Інші відходи			
	Натрій гідрофосфат	0,12				Антисептичний засіб «Sterillium»			0,3
	Натрій хлорид	0,01				Вата медична	0,08		
	Натрій біхромат	0,025				Пакет з поліетиленової плівки		5	
	Натрій гідроксид			0,15		Пробка гумова		25	
	Паранітрофенол	0,025				Рукавички госп.		4	

Продовження Табл. 4.4.

ДР2	Пеніцилін-стрепноміциновий р-н			2,55	ДР2	Рукавички хірургічні		20	
	Перекис водню 35%			0,08		Серветки з безворсової тканини		3	
	Фенолфталеїн	0,012				Спирт етиловий, 96%			0,3
	Фосфатно-сольовий буфер			4		Фільтр грубого очищення, РВ1		1	
	Б. Допоміжні речовини					Фільтр з активованим вугіллям, СС-10		1	
	Вода деіонізована (для приготування реагентів)			300		Фільтр поліпропіленовий, R30 (R20)		1	
	Вода очищена (для всіх стадій виробництва)			100		Фільтр тонкої очистки, Sartopore 2 XLG		1	
	Перекис водню, 50 %			0,74					
	Спирт етиловий 96%			0,3					
	В. Матеріали								
	Вата медична	0,08							
	Мило туалетне		2						
	Миючий засіб «Brillo»	2,75							
	Пакет з поліетиленової плівки		5						
	Пробка гумова		25						
	Рукавички госп.		4						
	Рукавички хірургічні		20						
	Серветки з безворсової тканини		3						
	Фільтр грубого очищення, РВ1		1						
	Фільтр з активованим вугіллям, СС-10		1						
	Фільтр поліпропіленовий, R30 (R20)		1						

Продовження Табл. 4.4.

	Фільтр тонкої очистки, Sartopore 2 XLG		1						
Всього:		486,6236			Всього:		486,6236		
ТПЗ	А. Напівпродукти:				ТПЗ	А. Напівпродукти:			
	Поживне середовища DMEM			2		Культуральна рідина гібридом штаму 95E1			2,5
	Середовище RPMI-1640 з L-глутаміном			0,5		1. Відпрацьовані ПС			
	Б. Діючі речовини:					Поживне середовища DMEM			2
	Вода водопровідна			20		Середовище RPMI-1640 з L-глутаміном			0,5
	Перекис водню, 50 %			0,088		2. Реактиви для аналізу			
	Спирт етиловий 96%			1		Ембріональна теляча сироватка	0,00 15		
	Реактиви для аналізу:					Імуноглобулінова мишача сироватка			0,00 2
	Ембріональна теляча сироватка	0,001 5				Кислота хлоридна			0,00 5
	Імуноглобулінова мишача сироватка			0,00 2		Кислота сірчана			0,00 47
	Кислота хлоридна			0,00 5		Фосфатно-сольовий буфер Дюльбека			0,3
	Фосфатно-сольовий буфер Дюльбека			0,3		3. Інші відходи:			
	В. Матеріали					Антисептичний засіб «Sterillium»			0,3
	Антисептичний засіб «Sterillium»			0,3		Вата медична	0,04		
	Вата медична	0,04				Вода водопровідна			20
	Колба Ерленмейєра		5			Колба Ерленмейєра		5	
	Кювета для спектрофотометрії, 0,5 мл		3			Кювета для спектрофотометрії, 0,5 мл		3	
	Наконечники 0-300 мкл		20			Наконечники 0-300 мкл		20	
	Піпетка автоматична на 20-200 мкл		15			Перекис водню, 50 %			0,08 8
	Піпетка автоматична 8-канальная на 0-200 мкл		5			Піпетка автоматична на 20-200 мкл		15	
	Планшет 96-лунковий		10			Піпетка автоматична 8-канальная на 0-200 мкл		5	

Продовження Табл. 4.4.

ТПЗ	Планшет полістироловий з плоским дном для ІФА		3		ТПЗ	Планшет 96-лунковий		10	
	Рукавички хірургічні		16			Планшет полістироловий з плоским дном для ІФА		3	
	Рукавички госп.		2			Рукавички хірургічні		12	
	Флакон пластиковий 25 см ²		10			Рукавички госп.		2	
	Флакон пластиковий 75 см ²		12			Спирт етиловий 96%			1
	Циліндр мірний на 0.25, 0.5 (л)		8			Флакон пластиковий 25 см ²		10	
						Флакон пластиковий 75 см ²		12	
						Циліндр мірний на 0.25, 0.5 (л)		8	
Всього:		133,2365		Всього:		133,2365			
ТП4	А. Напівпродукти:				ТП4	А. Напівпродукти:			
	Поживне середовища DMEM			250		Культуральна рідина гібридом штаму 95E1			34
	Посівний матеріал		10 ⁶			Біомаса		2,17·10 ⁸	
	Б. Діючі речовини:					1. Інші відходи:			
	Вода очищена			100		Поживне середовища DMEM			216
	Спирт етиловий, 96%			0,3		Антисептичний засіб «Sterillium»			0,3
	В. Матеріали					Вода очищена			100
						Спирт етиловий, 96%			0,3
	Антисептичний засіб «Sterillium»			0,3		В. Матеріали			
	Вата медична	0,04				Вата медична	0,04		
	Картридж FiberSell System		6			Картридж FiberSell System		6	
	Рукавички хірургічні		16			Рукавички хірургічні		16	
Всього:		372,64·10 ⁶		Всього:		372,64·10 ⁶			

Продовження Табл. 4.4.

ТП5	А. Напівпродукти:			
	Культуральна рідина гібридом штаму 95E1			34
	Б. Діючі речовини:			
	Амоній сульфат	3		
	Вода деіонізована			10
	Перекис водню 50%			0,2
	Спирт етиловий 96%			0,5
	В. Матеріали			
	Антисептичний засіб «Sterillium»			0,3
	Вата медична	0,03		
	Магнітна мішалка		5	
	Наконечники: 0-300 мкл		15	
	Піпетка автоматична на 50-200 мкл		3	
	Пробірки імунологічні		30	
	Пробірки центрифужні		15	
	Рукавички хірургічні гумові		20	
	Центрифуга Beckman		1	
	Фільтр грубої очистки PB1		1	
	Фільтр тонкої очистки Sartopore 2 XLG		1	
	Циліндр мірний на 0.01, 0.25, 0.5, 1, 2 (л)		10	
Всього:		149,03		
ТП6	А. Напівпродукти:			
	Супернатант МкАТ	11,8		
	Б. Діючі речовини:			
	Вода деіонізована			5
	Кислота лимонна	0,32		
	Кислота хлоридна			0,2
	Натрій-калієвий фосфатний буфер			3
	Перекис водню 50 %			0,12
	Спирт етиловий 96%			0,25
	Трис-основа			0,5

ТП5	А. Напівпродукти:			
	Супернатант МкАТ	11,8		
	Б. Діючі речовини:			
	Амоній сульфат	3		
	Вода деіонізована			10
	Перекис водню 50%			0,2
	Спирт етиловий 96%			0,5
	В. Матеріали			
	Антисептичний засіб «Sterillium»			0,3
	Вата медична	0,03		
	Магнітна мішалка		5	
	Наконечники: 0-300 мкл		15	
	Піпетка автоматична на 50-200 мкл		3	
	Пробірки імунологічні		30	
	Пробірки центрифужні		15	
	Рукавички хірургічні гумові		20	
	Центрифуга Beckman		1	
	Фільтр грубої очистки PB1		1	
	Фільтр тонкої очистки Sartopore 2 XLG		1	
	Циліндр мірний на 0.01, 0.25, 0.5, 1, 2 (л)		10	
Всього:		149,03		
ТП6	А. Напівпродукти:			
	Фракція МкАТ	5,2		
	Б. Діючі речовини:			
	Вода деіонізована			5
	Кислота лимонна	0,32		
	Кислота хлоридна			0,2
	Натрій-калієвий фосфатний буфер			3
	Перекис водню, 50 %			0,12
	Спирт етиловий 96%			0,25
	Трис-основа			0,5

Продовження Табл. 4.4.

ТП6	Фосфатно-сольовий буфер			5	ТП6	Фосфатно-сольовий буфер			5
	В. Матеріали					В. Матеріали			
	Антисептичний засіб «Sterillium»			0,3		Антисептичний засіб «Sterillium»			0,3
	Вата медична	0,03				Вата медична	0,03		
	Колба мірна		12			Колба мірна		12	
	Кювета для спектрофотометрії, 0,5 мл		3			Кювета для спектрофотометрії, 0,5 мл		3	
	Наконечники:20-1000 мкл		12			Наконечники:20-1000 мкл		12	
	Піпетка автоматична на 50-200 мкл		5			Піпетка автоматична на 50-200 мкл		5	
	Папір індикаторний		10			Папір індикаторний		10	
	Перекис водню 50 %			0,2		Перекис водню 50 %			0,2
	Спирт етиловий 96%			0,5		Спирт етиловий 96%			0,5
	Хроматографічна колонка		1			Хроматографічна колонка		1	
	Циліндр мірний на 0,5, 1, 2 (л)		6			Циліндр мірний на 0,5, 1, 2 (л)		6	
Всього:		52,42			Всього:		52,42		
ТПМ7	А. Напівпродукти:				ТПМ7	А. Напівпродукти:			
	Фракція МкАТ	5,2				Фракція МкАТ у ФСБ	1·10 ⁻⁶		
	Б. Діючі речовини:					Б. Діючі речовини:			
	Натрій азид	0,25				Натрій азид	0,25		
	Перекис водню 50 %			0,24		Перекис водню 50 %			0,24
	Спирт етиловий 96%			0,625		Спирт етиловий 96%			0,625
	Фосфатно-сольовий буфер			5		Фосфатно-сольовий буфер			5
	В. Матеріали					В. Матеріали			
	Антисептичний засіб «Sterillium»			0,5		Антисептичний засіб «Sterillium»			0,5
	Етикетка зовнішня (30×20) мм		40			Етикетка зовнішня (30×20) мм		40	
	Вата медична	0,04				Вата медична	0,04		
	Кріоампула		40			Кріоампула		40	
	Наконечники: 20-1000 мкл		20			Наконечники: 20-1000 мкл		20	
Піпетки серологічні		5		Піпетки серологічні		5			
Всього:		110,54			Всього:		110,54		

4.5 Контроль виробництва

Таблиця 4.5. Контроль виробництва

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР 1.1. Підготовка технологічного одягу Кт 1.1.1.	Тривалість	Годинник	Періодично, 2 рази на місяць	30 хв
	Тиск	Циферблат на приладі		2 атм
ДР 1.3.1. Підготовка 76 % розчину спирту Кх 1.3.1.1.	Розчин спирту етилового. Концентрація розчину	Мірний посуд, візуально	Кожна операція	76%
ДР 1.3.2. Підготовка розчину перекису водню. Концентрація розчину Кх 1.3.2.1.	Розчин перекису водню. Концентрація розчину	Мірний посуд, візуально	Кожна операція	1-3%
ДР 1.4. Підготовка виробничих приміщень Км 1.4.1.; Кт 1.4.1.	Вміст пилу	Візуально	Кожна операція	Мінімальний
	Мікробна контамінація	Мікробіологічний аналіз		Не допускається
ДР 1.5.1. Дезінфекція обладнання та інвентарю Кт 1.5.1.1; Км 1.5.1.1	Мікробна контамінація	Мікробіологічний аналіз	Кожна операція	Не допускається
ДР 1.5.2. Стерилізація фільтрів Кт 1.5.2.1; Км 1.5.2.1	Тиск стерилізації	Маномент	Кожна операція	1-2 атм
	Температура стерилізації	Регулятор температур		121-134°C
	Час стерилізації	Годинник		30 хв
	Мікробна контамінація	Стеритест	Після стерилізації	Колір тесту

Продовження Табл. 4.4.

ДР 1.6 Контроль мікробної контамінації повітря виробничих приміщень Км 1.6.1; Кт 1.6.1	Макс. допустима кількість життєздатних м/о класу чистоти D	Висів на чашки Петрі	Кожна операція	200 КУО
	Виробничого класу			<500 КУО
ДР 2.1. Приготування деіонізованої води Кт 2.1.1.	Ступінь де іонізації води	Візуально на індикаторному табло установки	Кожна операція	10 - 15 МОм
ДР 2.2 Приготування води очищеної Кт 2.2.1.	Вміст хлору у фільтрі	Йодометричний метод	Щоквартально	Вміст по паспорту
	Перепад тиску до і після фільтру	Манометр	Щоденно	Тиск по паспорту
	Електропровідність води	Кондуктометр	Протягом процесу	4,3 мСм/см
	Мікробіологічна чистота	Висів	Щоквартально	100 КУО в 1 мл
ДР 2.3. Підготування посуду Кт 2.3.1	Температура сушки	Регулятор температур	Кожна операція	160-200°C
	Час сушки	Годинник		2 год
ДР 2.4. Приготування стерильних реагентів Км 2.4.1.; Кт 2.4.1.	Концентрація розчинів	Мірний посуд, візуально	Кожна операція	Залежно від реагенту
	Мікробіологічна чистота та помутніння середовищ	Мікроскопіювання		Не допускається
ТП 3. Відтворення музейної культури Км 3.1.; Кт 3.1.	Мікробіологічна чистота	Мікроскопіювання	Кожна операція	Відсутність бактеріальної контамінації
	Фізіолого-морфологічний стан культури та генетичні особливості штаму	Візуально-порівняльний		Згідно паспорту на штам
ТП 3.1. Цетрифугування Кт 3.1.1.	Кількість обертів	Регулятор на приладі	Кожна операція	1300 об/хв
	Час осадження	Циферблат на приладі		3 хв

Продовження Табл. 4.4.

ТП 3.2. Інкубація культури Км 3.2.1.; Кт 3.2.1.	Температура культивування	Термометр	Протягом процесу	37°C
	Відносна вологість	Регулятор інкубатора		95%
	Вміст вуглекислого газу	Регулятор інкубатора		5%
	Час культивування	Годинник		3-4 доби
ТП 3.3. Скринінг життєздатності клітин Кт 3.3.1.; Кх 3.3.1.	Реакція антиген-антитіло	Візуально – зміна кольору індикатора	Кожна операція	Згідно реакції
ТП 3.4. Підготовка інокулята Кт 3.4.1.; Кх 3.4.1.	Температура культивування	Термометр	Протягом процесу	37°C
	Відносна вологість	Регулятор інкубатора		95%
	Вміст вуглекислого газу	Регулятор інкубатора		5%
	Початкова концентрація клітин	Метод розведення		4,5·10 ⁵ клітин/мл
	Час культивування	Годинник		4-5 доби
	Ріст культури	Візуально		Збільшується
ТП 4. Масове напрацювання МкАТ Км 4.1.; Кт 4.1.; Кх 4.1.	Температура культивування	Термометр	Кожна операція	37°C
	pH	Індикаторний папір		7,3
	Вміст кисню	Регулятор ферментеру		30%
	Витрата кисню	Витратомір апарату		0,06 л/год
	Витрата вуглекислого газу			0,06 л/год
	Витрата ПС			
	Час культивування	Годинник		8 діб
	Ріст культури	Візуально		Збільшується
ТП 5.1. Цетрифугування культуральної рідини Кт 5.1.1	Кількість обертів	Регулятор на приладі	Кожна операція	4000 об/хв
	Час осадження	Циферблат на приладі		20 хв
	Температура	Влаштований у прилад термометр		0-4°C
ТП 5.2. Фільтрація супернатанту Кт 5.2.1.	Відсутність сторонніх домішок	Пори фільтрувальної мембрани	Кожна операція	Не допускається

Продовження Табл. 4.4.

ТП 5.3. Концентрування розчину МкАТ Кт 5.3.1.; Тх 5.3.1.	Концентрація насичення амоній сульфату	Мірний посуд, візуально	Протягом процесу	40-50%
	Час перемішування	Годинник		30 хв
	pH	Індикаторний папір		6-7
	Температура суспензії	Термометр		0-4°C
ТП 5.4. Фільтрація МкАТ Кт 5.4.1.	Відсутність сторонніх домішок	Пори фільтрувальної мембрани	Кожна операція	Не допускається
ТП 6. Очистка антитіл Кт 6.1.; Кх 6.1.	pH фосфатного фуферу	Індикаторний папір	Протягом процесу	7,0-7,2
	Об'єм буферів	Мірний посуд, візуально		Відповідно до методики
	Швидкість пропускання рідини	Мірний посуд, візуально, годинник		1 мл/хв
	pH продукту	Індикаторний папір		7-8
	Зміна оптичної густини	Датчики на приладі		Відповідно до методики
	Швидкість промивки колонки	Мірний посуд, візуально, годинник		1,5-2,0 мл/хв
ТП 6.1. Переведення МкАТ у буферний розчин Кт 6.1.1.; Кх 6.1.1.	pH фосфатного фуферу	Індикаторний папір	Протягом процесу	7,2-7,4
	Швидкість елюції	Мірний посуд, візуально, годинник		2 мл/хв
	Час процесу	Годинник		20 хв
ПМВ 7. Розлив МкАТ Кт 7.1.	Концентрація продукту	Диференційний метод	Протягом процесу	1 мг/мл
	Температура зберігання	Термометр		Залежно від способу: +4°C; -20°C; -70°C
ЗВ 8.1. Знешкодження відходів відпрацьованих ПС Кт 8.1.1.	Тиск автоклавування	Манометр	Кожна операція	1-1,5 атм
	Час автоклавування	Годинник		40 хв

Продовження Табл. 4.4.

ЗВ 8.2. Нейтралізація кислотних і лужних стоків Кт 8.2.1.	pH	Індикаторний папір	Кожна операція	6-7
ЗВ 8.3. Знешкодження потенційно інфекційних відходів Кт 8.3.1.	Тиск автоклавування	Манометр	Кожна операція	0,1 МПа
	Час автоклавування	Індикаторний папір		1 год
	Час витримки	Годинник		20 год
ЗВ 8.4. Розбавлення та злив нетоксичних та малотоксичних відходів Кт 8.4.1.	Розбавлення	Мірний посуд, візуально	Кожна операція	500-1000 раз

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва представлена на схемі на форматі А1.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.

Центральним елементом біотехнологічного процесу є біореактор, від конструкції якого залежить технічне та економічне виконання процесу. Основне призначення апарату полягає у забезпеченні оптимальних умов для досягнення максимальної ефективності процесу в біологічній системі. Тваринні клітини характеризуються низькою швидкістю росту та чутливістю до механічних пошкоджень, тому біореактори потребують особливих вимог конструкційного виконання [58, 59].

У роботі запропонована класифікація біореакторів для культивування клітин ссавців (див. Рис. 5.1) на основі принципу введення енергії: всі реактори були розділені залежно від режиму роботи – статичного чи динамічного.



Рисунок 5.1. Класифікація біореакторів для культивування тваринних клітин [58].

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Шебеда Д. С.			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Арк.
Конс.		Шибецький В.Ю.					100
						<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>	
Керівн.		Дзигун Л. П.					
Затв.							
						Аркушів	135

Процес культивування у статичному режимі, найчастіше, застосовується на етапах дослідницьких робіт за лабораторних умов. Для культивування в динамічному режимі науковці прагнуть максимального забезпечення гомогенного режиму перемішування, задля уникнення градієнтів температури та рН, підвищених концентрацій субстрату та продуктів у застійних зонах реактора. Для культивування клітин використовуються біореактори з періодичною (*batch*), періодичною з підживленням (*feed-batch*) або безперервною (*continuous*) діями із затриманням біомаси або без.

Для культивування суспензійної клітинної культури найчастіше використовуються біореактори змішування або ерліфтні. З метою зниження ризику механічного пошкодження клітин для аерації використовують барботери, систему поверхневої аерації або безбульбашкової аерації через напівпроникні мембрани (див. Рис. 5.2).

Іншим поширеним видом апаратів для суспензійних культур є хвильові біореактори, конструкція яких представлена металевим або пластиковим корпусом з одноразовим пакетом, що містить поживне середовище та культивовані клітини. Корпус ферментера розташований на платформі, яка за допомогою коливальних рухів створює рух рідини з культурою клітин. Такі хвилі забезпечують перемішування і перенесення кисню, створюючи ідеальне середовище для росту клітин (див. Рис. 5.2) [58, 59].

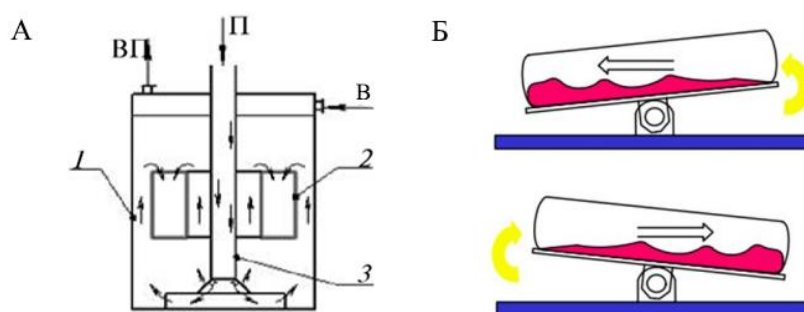


Рисунок 5.2. Біореактор суспензійного культивування: А – ерліфтно-периферійний ферментер. 1–корпус, 2–дифузор, 3–повітровід, В–вхід рідини, П–повітря, ВП–відпрацьоване повітря; Б – принцип дії хвильового біореактору з одноразовим мішком [60, 61].

При культивуванні адгезивних культур клітин продуктивність біореактора значним чином залежить від питомої площі росту, що досягається застосуванням мікроносіїв. Залежно від виду клітин і цілі культивування, використовують як мікроносії з гладкою поверхнею, так і носії з макропорами. Важливе значення приділяється підбору матеріалів для їх виготовлення, що виключають токсичність для клітин, здатність поглинати компоненти середовища та можливість повторного використання, шляхом стерилізації. Крім того, властивість універсальності дає можливість використовувати один тип мікроносіїв для культивування різних клітин. Серед матеріалів, які застосовуються для вирощування тваринних клітин, варто згадати мікроносії з поперечно-зшитих декстрану, агарози, полівінілпіролідону, поліакрилонітриду, а також пористого силікагелю, полістиролу, капрону, нейлону, алюмосилікат і т.д. [62, 63].

Принципово іншим прикладом апарату для адгезивного росту клітин є ролерні установки, в яких клітини ростуть в циліндричних посудинах – бутлях, зазвичай з боросилікатного скла, з невеликою кількістю поживного середовища. Бутлі обертаються в горизонтальному положенні з невеликою швидкістю (близько 12 оборотів/хв). При цьому забезпечується постійне перемішування середовища та інтенсивний ріст клітин. З метою збільшення ефективності росту клітин ролерні установки забезпечені системою для заміни середовища та видалення продуктів метаболізму без зупинки обертання. Наявність випуклих складок на бічній стінці бутлів створює додаткову поверхню (див. Рис. 5.3) [58].

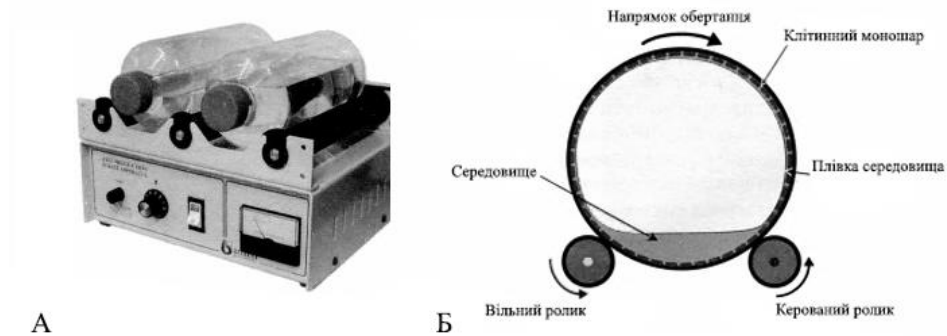


Рисунок 5.3. Ролерний біореактор: А – малий настільний стелаж; Б – принцип роботи ролерної системи [64].

Останнім часом, наукові розробки направлені в сторону мембранних біореакторів, у яких мембрана виконує свою основну функцію як напівпроникна перегородка, що дозволяє пропускати рідкі компоненти поживного середовища та затримувати клітини, або служить у якості пористої стінки, що сприяє більш рівномірному розподілу середовища й організації безбульбашкової аерації.

Мембранні біореактори характеризуються високою продуктивністю клітинної маси на порядок вищою від класичного апарату, що досягається постійним відведенням продуктів метаболізму та безперервним підводом поживного середовища; розвиненою питомою поверхнею росту зі зниженням ризику механічних пошкоджень клітин шляхом адгезії в порах [58, 65].

Одним з перспективних і часто використовуваних мембранних біореакторів є половолоконні системи з розташуванням клітин на зовнішній поверхні мембрани (див. Рис. 5.4). У таблиці 5.1.1 наведено порівняння біореакторів, що використовують для культивування тваринних клітин, з якої видно переваги мембранного біореактора половолоконного типу.

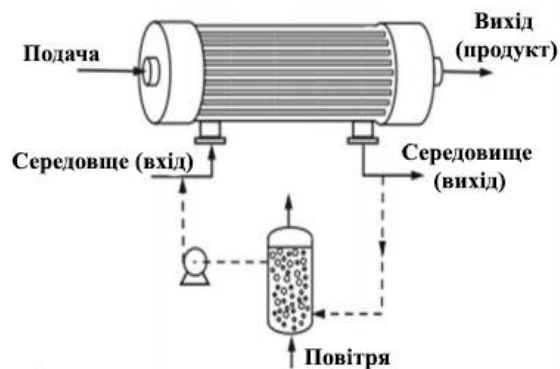


Рисунок 5.4. Принцип дії порожникової біореактору [58].

Таблиця 5.1. Основні характеристики систем і ферментерів для культивування тваринних клітин [58]

Параметр	Колба/бутель в ролерній с-мі/ одноразові мішки	Мембранний біореактор (порожнистовий)	Суспензійний біореактор (змішування, ерліфтний)	Біореактор зі зваженим шаром або мікро- чи макроносіями
Щільність клітин	1	3	2	2-3
Гомогенність	1	1	3	2
Напруга зсуву	Ні	Ні	Так	Ні
Концентрація продукту	1	3	2	2
Продуктивність	1	3	2	2
Ефективність викор. ПС	3	1	3	2
Безперервний процес	Ні	Так	Так/Ні	Так
Контроль	0	1	2	3
Виділення цільового продукту	1	3	2	2
Стерилізація паром	Ні	Ні	Так	Так
Повторність використання	Ні	Ні	Так	Так

0 - неможливо, 1 - 3 ефективність

На основі порівняльної характеристики існуючих апаратів, для культивування моноклональних антитіл доцільно обрати установку порожникового типу, оскільки апарат задовольняє більшість необхідних умов з одержання високоефективного продукту.

Половолоконний біореактор являє собою складну систему, функціональною одиницею якого є циліндричні картриджі, що містять пучок порожнистих трубок діаметром 200 мкм. Корпуси апаратів виготовляють з органічного скла, полістиролу або полікарбонату. Як матеріал для мембранних волокон в біореакторах, використовують речовини з пористими властивостями, наприклад, полісульфону, поліметилметакрилату.

Завдяки компактному розташуванню порожнистих волокон значно збільшується площа поверхні, що забезпечує високу щільність клітин. Залежно від руху потоків поживного середовища в апаратах, простір всередині реактора поділяють на дві частини: міжволоконний (МВ) і внутрішньоволоконний (ВП).

Для культивування клітин використовується наступний принцип дії: верхні отвори в корпусі біореактора служать для розміщення клітин в міжволоконному просторі та для відводу метаболітів, а також при необхідності для подачі додаткового потоку поживного середовища. Під фронтальні патрубки надходить основний потік поживного середовища, що є основою внутрішньоволоконного простору. Частина середовища проходить крізь пори у волокнах (пермеат) і потрапляє безпосередньо до клітин, забезпечуючи їх необхідними речовинами для росту та життєдіяльності. Залишки поживного середовища (ретентат) видаляються з біореактора з протилежної сторони іншим патрубком (див. Рис. 5.5) [58].

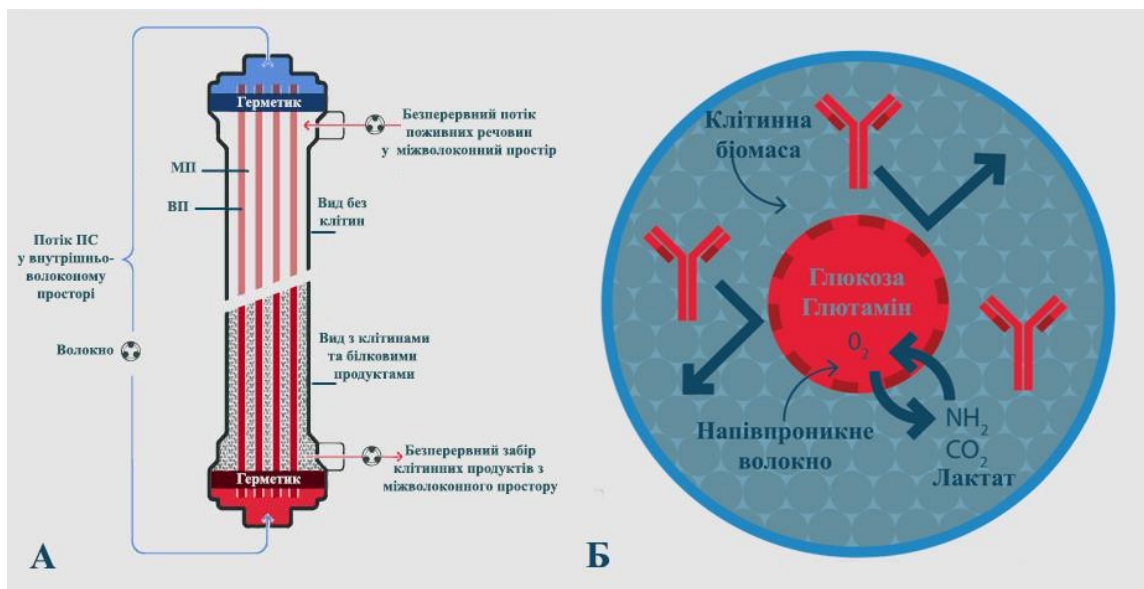


Рисунок 5.5. А – схематичне зображення картриджу; Б – поперечний зріз картриджу, що демонструє волокно (червоне) з ПС, яке оточує міжволоконний простір (синій) [66].

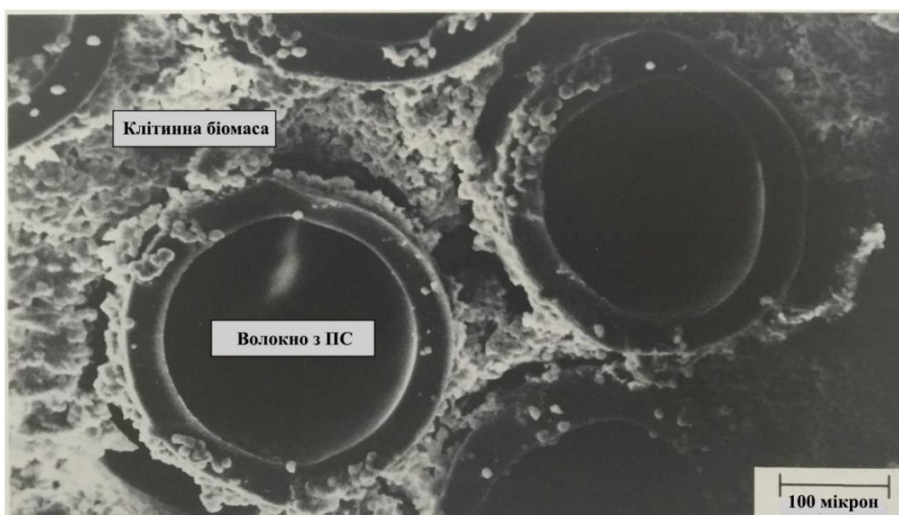


Рисунок 5.6. Мікрофотографія поперечного зрізу волокна, що демонструє ріст клітинної біомаси [66].

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Проведення математичного моделювання процесів гідродинаміки та масообміну в біореакторах такого типу є важливим етапом планування, підготовки та проведення експерименту. Усі наведені розрахунки проведені з метою підвищення продуктивності та оптимізації роботи мембранного

біореактора C2025 FiberCell System шляхом збільшення загальної кількості волокон з 20 до 60 [58].

5.2.1 Моделювання кінетики росту гібридом

Вибір кінетичної залежності досить часто визначається на основі візуальної схожості експериментальних даних і розрахункової кривої. У такому випадку для опису кінетики росту клітин гібридних клітин за основу була розглянута експоненціальна залежність виду:

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (5.1)$$

де N - кількість клітин в момент часу t , штук; N_0 - початкова кількість клітин, штук; t - час культивування, доби; μ - питома швидкість росту клітин, доба⁻¹.

Експоненціальна модель є відносно простим видом залежності росту клітин від часу, проте в цьому випадку величина відносної похибки досить велика, тому було розглянуто варіант застосування логістичного рівняння Ферхюльста, що враховує обмежений ріст популяції (5.2). Доцільність застосування рівняння заснована на припущенні, що досліджувані об'єкти мають аналогічні умови росту клітин, а саме процес культивування йде до повного заповнення клітинами поверхні половолоконної мембран і відсутність лімітуючих факторів росту(див. Рис. 5.7) [58].

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left(1 - \frac{N}{K}\right) \quad (5.2)$$

де μ - питома швидкість росту клітин, доба⁻¹, K - ємність популяції (параметр, що характеризує граничну чисельність популяції).

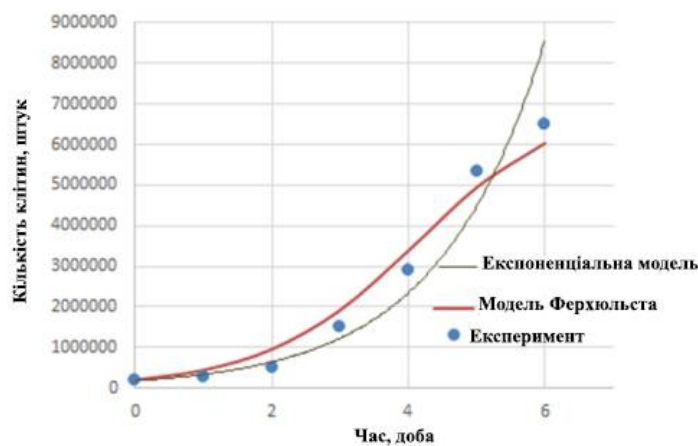


Рисунок 5.7. Порівняння експериментальних даних і результатів розрахунку по експоненційній залежності та рівняння Ферхюльста [58].

Таким чином, рівняння для росту клітин, засноване на моделі Ферхюльста має вигляд:

$$\frac{dN}{dt} = 0,89N\left(1 - \frac{N}{1,8 \cdot 10^7}\right) \quad (5.3)$$

5.2.2. Розрахунок швидкостей споживання глюкози і виділення метаболітів

За результатами аналізу [58] середня кількість глюкози, що споживається однією клітиною за добу складає $v = 2,02 \cdot 10^{-8}$ ммоль/добу, тоді масова концентрація глюкози в поживному середовищі рівна $C_0 = 5,4$ г/л.

Використовуючи середню кількість глюкози, яка споживається однією клітиною за добу, вихідну концентрацію глюкози в середовищі та молекулярну масу глюкози було отримано значення витрати поживного середовища, необхідного для забезпечення харчових цілей однієї клітини. Цей потік для даної конструкції біореактора є потоком, що проходить через поволоконну мембрану, тобто потоком пермеату.

$$q^п = \frac{\vartheta \cdot M}{c_0} \quad (5.4)$$

Для збереження життєздатності клітинам необхідно отримувати поживне середовище в надлишку. Як правило, для забезпечення сприятливих умов росту, необхідно подавати потік середовища приблизно в 4-6 рази більший потоку, що

споживається однією клітиною. Таким чином, потік пермеату для однієї клітини $q^п=7,9 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3/\text{с}$ [58, 59].

Частка глюкози, що витрачається на поділ клітин, становить 72%, відповідно, частка для підтримки життєдіяльності клітин – 28%. Тоді об'ємна витрата продуктів метаболізму для однієї клітини $q^м=5,69 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3/\text{с}$.

З точки зору геометрії половолоконна мембрана являє собою циліндр, у якого висота на багато більша діаметру, тому площа поверхні всіх половолоконних мембран, на якій можуть рости клітини, виходячи з базових розмірів реактору, складає $S_m=8,98 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2$ [58].

Враховуючи, що початкова кількість клітин $N_0=1347800$ штук, то можна визначити кількість клітин в будь-який момент часу культивування за рівнянням (5.3).

Оскільки площа поверхні половолоконної мембрани, яку займає одна клітина, являє собою коло з діаметром, рівним діаметру клітини, то її площа складає $s = 1,13 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2$.

Для того щоб розрахувати максимально можливу площу всіх клітин, було прийнято, що клітина на поверхні мембрани вписана в правильний шестикутник, адже саме цією геометричною фігурою можна заповнити площину без пробілів і накладень. Кількість шестикутників, необхідних для повного заповнення ними поверхні половолоконної мембрани, було розраховано з урахуванням того, що площа кожного шестикутника повинна бути оптимальною, щоб на ній повністю вміщувалася клітина, а вільна від клітини площа була мінімальна. Для даного типу клітин, така площа складає $s_{opt} = 1,24 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2$. При діленні площі, що займає одна клітина, на оптимальну площу отримуємо максимальну кількість клітин, що можна отримати при культивуванні $N_{max} = 2,17 \cdot 10^8$ штук [58].

Аналіз росту клітин на чашках Петрі [58] дозволяє зробити висновок про те, що 95% клітин вирости за 8 діб. Решта 5% ростуть протягом ще 2-х діб, при контактній інгібіції. Час закінчення процесу в половолоконному біореакторі було прийнято вважати $t = 8$ діб.

З урахуванням максимальної кількості клітин, можна обчислити відсоток заповненої клітинами поверхні половолоконної мембрани в будь-який момент часу як:

$$S_m^{\%} = \frac{N}{N_{max}} \cdot 100\% \quad (5.5)$$

5.2.3. Моделювання внутрішньоволоконного простору біореактора

- Розрахунок коефіцієнта проникності мембранного волокна.

У процесі культивування клітини поступово заповнюють поверхню волокон, що чинить додатковий опір потоку поживного середовища, проникаючого крізь мембрану. Проникність, розрахована при відсутності опору клітинного шару, в початковий момент часу є максимальним значенням для половолоконної мембрани $\alpha_{max} = 4,8 \cdot 10^{-15} \text{ м}^2$. За результатами досліджень [58, 67] шар клітин знижує проникність половолоконної мембрани лінійно з ростом їх чисельності, отже, проникність мембрани, повністю заповненою клітинами ($N = N_{max}$), дорівнює $\alpha_{min} = 8,3 \cdot 10^{-17} \text{ м}^2$.

На основі залежності кількості клітин від часу можна розрахувати залежність проникності мембрани від часу для досліджуваного процесу:

$$\alpha = \alpha_{min} + \frac{(\alpha_{max} - \alpha_{min})}{N_{max}} \cdot N \quad (5.6)$$

- Розрахунок об'ємної витрати поживного середовища, що споживається клітинами.

У ході дослідження [58] були отримані графіки зміни тиску і швидкості всередині половолоконної мембрани по довжині волокна. На рисунках 5.8, та 5.9 представлені результати для витрати ПС 12 л/год (максимальне значення, вказане виробником) на вхід у внутрішньоволоконний простір. З рисунка 5.8 видно, що з часом відбувається зменшення значення швидкості на виході з внутрішньоволоконного простору по довжині мембранного елемента. Це можна пояснити зменшенням кількості потоку пермеату, що проходить крізь мембрану, внаслідок накопичення клітин на мембранній поверхні, які створюють опір

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		110

поток. Тиск, своєю чергою, зростає по довжині мембрани з часом культивування (див. Рис. малюнок 5.9).

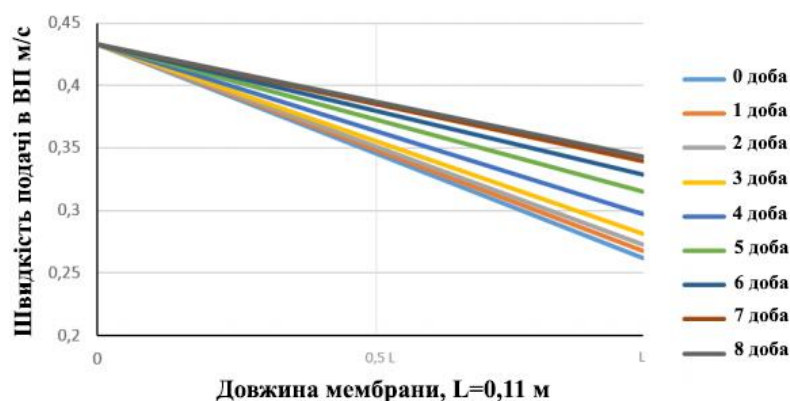


Рисунок 5.8. Зміна швидкості в ВП по довжині мембрани [58].

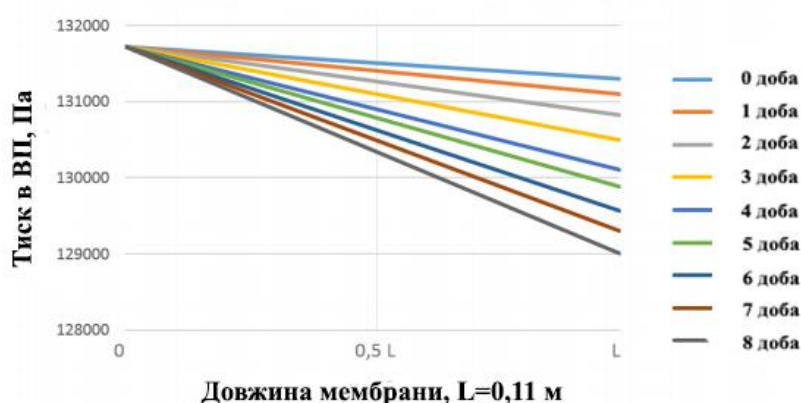


Рисунок 5.9. Зміна тиску в ВП по довжині мембрани [58].

З метою дослідження гідродинаміки потоків у внутрішньоволоконному просторі були розглянуті варіанти подачі поживного середовища на 1-шу і 8-му добу процесу культивування, що відповідає максимальному та мінімальному значенню коефіцієнта проникності. Зі збільшенням чисельності клітин збільшується їх потреба у поживних речовинах, тому зростає значення об'ємної витрати пермеату, необхідного для забезпечення життєдіяльності клітин. Отже, зростає опір, який чиниться клітинним шаром на потік через мембрану. У зв'язку з цим, необхідно збільшувати витрату поживного середовища, що подається на вхід в біореактор.

Моделюючи у CFD-пакеті ANSYS Fluent, видно, що поживне середовище вільно проникає через більшу частину пор, оскільки на 1-шу добу культивування, кількість клітин на поверхні волокна мінімальна, клітини не закривають пори, і, отже, шар клітин не чинить опору потоку середовища, через що, велика кількість потоку середовища проникає крізь пори, не досягаючи середини довжини волокна, що показує зміну кольору від червоного до блакитного (див. Рис. 5.10) [58].

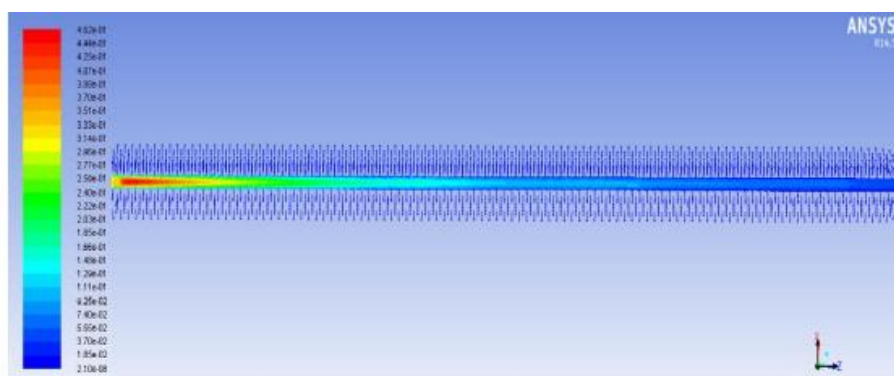


Рисунок 5.10. Розподіл швидкості потоку поживного середовища по довжині мембранного волокна на 1-шу добу культивування (потік середовища зліва направо) [58].

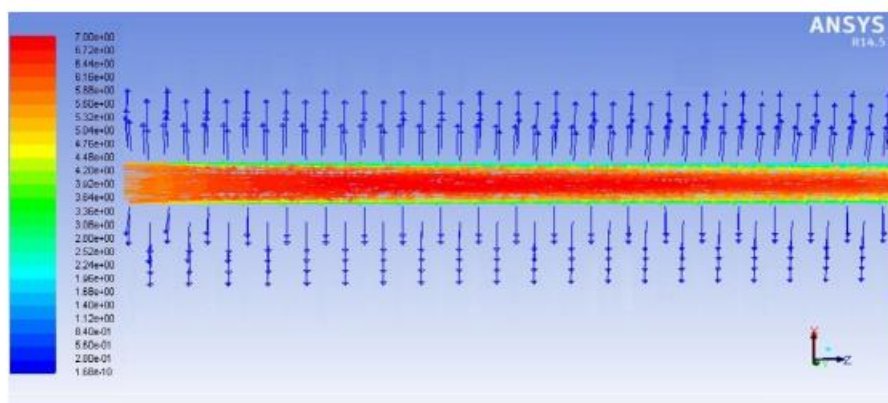


Рисунок 5.11. Розподіл швидкостей потоку поживного середовища на вході в мембранне волокно на 8 добу культивування (потік середовища зліва направо) [58].

У результаті аналізу розподілу швидкостей було встановлено, що на 1-шу і 8-му добу культивування при мінімальній та максимальній витраті по довжині

половолоконної мембрани (що відповідає максимальному та мініимальному коефіцієнту проникності) забезпечується найоптимальніший потік пермеату, необхідний для збереження життєдіяльності клітин [58].

- Вибір режиму подачі поживного середовища у внутрішньоволоконний простір

Зі збільшенням чисельності клітин зростає підтримуване значення необхідного потоку на мембрані (потік пермеату), необхідного для забезпечення життєдіяльності клітин, але зростає опір, який створює клітинний шар через мембрану. У зв'язку з цим збільшується потік поживного середовища, який потрібно подати на вхід в біореактор.

Таблиця 5.2. Результат розрахунку середнього потоку та оптимальних витрат [58].

Доба культивування	Середній потік пермеату, л/год	Об'ємні витрати на вході, л/год
0	0,04	1
1	0,09	1,5
2	0,2	2,3
3	0,4	3,1
4	0,9	4,5
5	1,89	7,6
6	3,3	12,7
7	4,86	19,4
8	6,16	33,3

Для кінцевого етапу культивування, коли проникність мембран мінімальна, потік необхідно підтримувати не менше, ніж 6,2 л/год. Об'ємна витрата, що подається на вхід біореактора для даного етапу культивування, становить 33,3 л/год [58].

- Розрахунок необхідної швидкості потоку

Припустимо, що в процесі культивування ріст клітини починає пригнічуватися тоді, коли обсяг продуктів метаболізму, що знаходиться біля клітини, рівний обсягам клітин. Враховуючи теоретичний розмір однієї клітини та час, за який клітина виділяє певний обсяг метаболіту (5.7), можна розрахувати обсяг продуктів метаболізму, що виділяється однією клітиною в одиницю часу (5.8).

$$t_u = \frac{V}{q^M} = 73 \text{ с} \quad (5.7)$$

При повному заповненні мембранного волокна клітинами, через 73 с, об'єм виділених продуктів метаболізму складатиме:

$$V^M = q^M \cdot N_{max} \cdot t_u = 9,83 \cdot 10^{-8} \text{ м}^3 \quad (5.8)$$

Отже, за час $t_u = 73 \text{ с}$ з міжволоконного простору необхідно відвести обсяг рідини, що дорівнює $9,83 \cdot 10^{-8} \text{ м}^3$, а значить, для того щоб відводити продукти метаболізму від клітин, витрата рідини, проникаючої через волокно в міжволоконний простір в останню добу культивування, має бути не менше цього показника:

$$Q = \frac{V^M}{t_u} = 0,0049 \text{ л/год} \quad (5.9)$$

З огляду на об'ємну витрату рідини в міжволоконному просторі біореактора та площі поперечного перерізу мембранного модуля $S_{\pi} = 0,00011 \text{ м}^2$, отримано [1] мінімальну лінійну швидкість потоку поживного середовища, при досягненні якої продукти метаболізму будуть своєчасно відведені від клітин:

$$v = \frac{Q}{S_{\pi}} = 3,9 \cdot 10^{-6} \text{ м/с} \quad (5.10)$$

У порівнянні з вихідною моделлю, модифікований картридж біореактора має збільшену кількість волокон мембрани, і як наслідок більшу площу поверхні росту клітин. Конструктивні та технологічні параметри картриджу представлені в таблиці 5.3. та таблиці 5.4, відповідно.

Таблиця 5.3. Конструктивні параметри картриджу біореактора [58].

Параметр	Значення
Довжина корпусу	13 см
Діаметр корпусу	22 мм
Кількість волокон	60 шт.
Довжина мембранного волокна	11 см
Товщина мембрани	300 мкм
Діаметр ВП мембрани	700 мкм
Діаметр мембрани зовнішній	1300 мкм

Таблиця 5.4. Технологічні параметри картриджу біореактора [58].

Параметр	Значення
Середня кількість глюкози, що споживається однією клітиною за добу	$v = 2,02 \cdot 10^{-8}$ ммоль/добу
Масова концентрація глюкози в поживному середовищі рівна	$C_0 = 5,4$ г/л.
Площа поверхні мембран для росту клітин	$S_m = 8,98 \cdot 10^{-4}$ м ²
Потік пермеату для однієї клітини	$q^n = 7,9 \cdot 10^{-15}$ м ³ /с
Об'ємна витрата продуктів метаболізму для однієї клітини	$q^m = 5,69 \cdot 10^{-15}$ м ³ /с.
Початкова кількість клітин	$N_0 = 1347800$ шт.
Максимальна кількість отриманих клітин	$N_{max} = 2,17 \cdot 10^8$ шт.
Час росту клітин	$t = 8$ діб
Середній час виділення метаболіту	$t_u = 73$ с
Об'єм метаболіту, виділений за час t_u	$V^m = 9,83 \cdot 10^{-8}$ м ³
Витрата рідини, що проходить крізь мембрану	$Q = 0,0049$ л/год
Мінімальна лінійна швидкість потоку ПС	$v = 3,9 \cdot 10^{-6}$ м/с

З отриманого метаболіту при осадженні імуноглобулінів та хроматографічній очистці, вихід продукту коливається в межах 20-40 мг/мл [52]. Зважаючи на те що з одного циклу культивування можна отримати 5-10 ампул готового продукту, для промислового виробництва необхідно декілька картриджів для одночасного культивування. Компанія Cell Culture Company випускає спеціальні установки, основою яких картриджі половолоконного типу. Установка уміщує від 6 до 10 картриджів з одночасним культивуванням. Система керування установки має автоматичне керування, варіабельність режимів культивування забезпечують необхідні виробничі умови [68].

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Головне технологічне обладнання та контрольно-вимірювальні прилади наведені у відповідній специфікації (див. Табл. 5.5).

Таблиця 5.5. Специфікація обладнання, контрольно-вимірювальних приладів та систем автоматизації [69, 70, 71]

Позиція	Позначення	Найменування	Кількість	Маса	Примітка
1	2	3	4	5	6
Р-1 Р-4 Р-7 Р-31 Р-32	ВЕЕ	Реактори для приготування мийно-дезінфікуючого розчину, розчинів кислот і лугів та буферних розчинів, місткість 5 м^3 , $D = 1800$, коефіцієнт заповнення 0,7; завантаження концентратів через люк, нижній злив, механічне перемішуванням лопатевою мішалкою, працює при атмосферному тиску, потужність електродвигуна з редуктором 20 кВт, частота обертання вала мішалки 1 с^{-1} .	5		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Ф-2 Ф-5 Ф-8	ФС по ТММ ОРК 2.20-03	Фільтр ситчастий фланцевий	3		Збірний, Неірж. сталь 12Х18Н10Т
З-3 З-6 З-9		Збірник для готових розчинів. Місткість 5 м^3 .	3		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Пз-10		Повітрозбірник	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Ф-11 Ф-16	ФЯР тип Рекка	Фільтр попереднього очищення повітря запиленістю до 5 мг/м^3 . Неперервної дії коміркового типу заповнений 12 металічними гофрованими сітками, змащені маслом. Пилоємність фільтру 200 г/м^2 . Ефективність очистки 75%. Питома продуктивність $3000 \text{ м}^3/\text{м}^2 \text{ год}$. Гідравлічний опір – 40 Па. Цикл роботи – 70 год.	2		Збірний

Продовження табл. 5.5

В-12 В-17		Вентилятор відцентровий	2		Збірний
К-13	900-31-2	Компресор повітряний. Продуктивність 970 м ³ повітря /хв. Тиск на виході 0,34МПа. Потужність електродвигуна 3500кВт. Температура повітря на виході до 200°С.	1	1570	Збірний
Ф-14 Ф-15	ФТО-1000	Індивідуальний фільтр стерилізації (тонкої очистки) повітря. Продуктивність 1000 м ³ /год, швидкість руху повітря – 0,05м/с, площа поверхні фільтрування 10м ² , гідравлічний опір потoku повітря 800 Па, коефіцієнт проскоку – 0,001. Фільтруючий матеріал гофровані елементи з тканини Петрянова – ФПП-1,2-1,5. Стерилізація аерозолем формаліну з нейтралізацією аерозолем аміаку	2		Збірний
Н-18 Н-23		Насос лопатевий. Напір 120 м; подача 30м/с; ККД 0,85-0,9.			Збірний
Ф-18 Ф-21 Ф-24 Ф-25 Ф-26	ФС по ТММ ОРК 2.20-03	Фільтр ситчастий фланцевий	5		Збірний, Неірж. сталь 12Х18Н10Т
36-19		Барометричний конденсатор	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
3-20 3-27		Збірники для води місткістю 10 м ³	2		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Н-24 Н-29 Н-36		Відцентрові насоси	3		Збірний

Продовження табл. 5.5

Д-30		Об'ємно-ваговий дозатор для компонентів ПС	1		Неірж. сталь 12X18H10T
Тс-33		Технологічний етап відворення музейної культури штаму гібридом 95E1			
Тс-34		Технологічний етап напрацювання інокуляту в колбах			
Р-35		Термошафа з 6-10 половолоконними картриджами; потік ПС 500-2000 л; повна автоматизація процесу	1	418 кг	Збірний AcuSyst-Xcellerator Cell Culture Company
Ц-37		Центрифуга з охолоджуючим пристроєм. Макс. місткість 3 л; до 10200 об/хв;	1		Збірний Beckman B99516
З-38 З-40 З-41 З-43		Збірники супернатанту об'єм 5л	4		Неірж. сталь 12X18H10T
Ф-39		Фільтр тонкої очистки з порами 0,8-0,2 мкм.	1		Збірний Sartopore 2 XLG
Х-42		Хроматографічна колонка зі швидкістю потоку до 150 мл/хв. Внутрішній об'єм $1,6 \cdot 10^{-5}$ м ³ ; об'єм рухомої фази $1,53 \cdot 10^{-5}$ м ³ ; пористість колонки 0,96	1		Avant ÄKTA
ГФ-44		Пристрій для розливу кінцевого продукту в ампули	1		Збірний
КП 1.1 КП 3.1 КП 4.1 КП 6.1 КП 7.1 КП 9.1 КП 21.2 КП 28.2	ВБЕ-Ф60-40У-2242-ЛА	Безконтактний ємнісний датчик рівня рідини. Відстань роботи 40 мм; діапазон напруги 100-250 АС; номінальний струм 5 мА; робоча температура від -25 до +85°C.	8	0,238 кг	Збірний «Сенсор»

Продовження табл. 5.5

КП 1.2 КП 3.2 КП 4.2 КП 6.2 КП 7.2 КП 9.2 КП 21.1	SH Z51P5- 31P-LZ	Температурний датчик. Робоча напруга до 10 В; потужність 1000 Вт; діапазон температури -40 до +60°C.	7		Збірний «ТЕКО»
КП 2.1 КП 2.2 КП 5.1 КП 5.2 КП 8.1 КП 8.2	CPG1000	Цифровий манометр. Діапазон робочого тиску від 0 до 700 бар; резиновий захистний кожух, робоча температура -10 до +50°C. Похибка до 0,05%.	6		Збірний «Wika»
КП 4.3 КП 7.3 КП 35.3 КП 40 КП 43	pH/ION 7320	pH-метр. Діапазон від 0 до 14 pH; робоча температура -5 до +105; похибка $\pm 0,004$;	5		Збірний «WTW»
КП 11.1 КП 11.2 КП 15.1 КП 16.1	DG-10-E	Цифровий манометр. Діапазон робочого тиску від 0 до 600 бар; похибка 0,5%	4		Збірний «Wika»
КП 13.1 КП 21.1 КП 28.1	SH Z51P5- 35P-LZ	Температурний датчик. Робоча напруга до 5 В; потужність 1000 Вт; діапазон температури -40 до +60°C.	3		Збірний «ТЕКО»
КП 23 КП 29	МІР-38	Витратомір для води електромагнітний. Точність: $\pm 0,5\%$ Вихідні сигнали: 4-20мА, Температура середовища, 40-150°C.	2		Збірний
КП 18.1 КП 18.2 КП 19.1 КП 21.1 КП 22.1 КП 24.1 КП 24.2 КП 25 КП 26	АДМ-100.1	Манометр стрілковий. Межа вимірювань 1 МПа. Необхідний струм до 60 мА. Дискретність 1%. Клас точності 1,5. Робоча температура -10 до +60°C.	9		Збірний «АГАВА КБ»

Продовження табл. 5.5

КП 35.1	SHT Z51P5-41P- LZ	Датчик температури та вологості. Робоча напруга до 10 В; потужність 1000 Вт; діапазон температури -40 до +60°C.	1		Збірний «ТЕКО»
КП 35.2	MAN-R- PDC	Цифровий манометр. Межа вимірювань 2-700 бар; похибка 0,5%; макс. робоча температура 100°C.	1		Збірний «KOBOLD»

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Основними елементами системи управління охорони праці та навколишнього середовища на підприємствах України виступають лімітування, ліцензування, сертифікація і паспортизація, які проводяться згідно з технічними та екологічними вимогами нормативної документації. Нинішні тенденції розвитку соціально-екологічних процесів вимагають удосконалення систем управління природокористуванням з урахуванням забезпечення екологічної безпеки, гармонійного поєднання соціально-економічних і еколого-містобудівних пріоритетів розвитку міст і прилеглих територій [72].

Охорона праці є обов'язковим і важливим елементом організації будь-якого підприємства. Правові основи охорони праці регулюються організацією роботи в областях виробничого процесу, структури нагляду та контролю, комісії розслідування і обліку нещасних випадків. Охорона праці на території країни визначається Законом України (ЗУ) про охорону праці [73], системою стандартів безпеки праці (ССБТ), санітарними нормами та правилами, спеціальними міжгалузевими (ДНАОП) і галузевими (НАОП) нормами та стандартами, СНіПами, ДСТУ.

Підприємство зобов'язане створити на робочому місці в кожному структурному підрозділі умови праці відповідно до нормативно-правових актів, а також забезпечити додержання вимог законодавства, щодо прав працівників у галузі охорони праці (див. табл. 5.4.1).

Таблиця 5.6. Характеристика робочого місця

Найменування показника	Значення показника	Критерій вибору значення показника	Регламентуючий документ
Габаритні розміри приміщень, кількість робочих місць	Площа приміщення	Комфорті умови праці	ДСТУ Б В.2.2-29:2011 [74]
Умови мікроклімату	Температура, вологість, швидкість потоку повітря	Комфорті умови праці	ДСН 3.3.6.042-99 [75]
Вентиляція	Рівень кисню	Безпека умов праці	НПАОП 0.00-1.27-09 [76]
Вид природного освітлення	Бокове	Комфорті умови праці	ДБН В.2.5-28-2006 [77]
Вид штучного джерела світла	ЛБ-80, ЛБ-65	Комфорті умови праці	
Рівень шуму	до 60 дБА	Комфорті умови праці	ДСН 3.3.6.037-99 [78]
Вібрація	Механічні коливання	Комфорті умови праці	ДСН 3.3.6.039-99 [79]
Робота з електричними приладами	Напруга	Безпека умов праці	НПАОП 73.1-1.11-12 [80]
Клас приміщення з пожежної безпеки	Клас	Безпека умов праці	ДСТУ 2272:2006 [81] НАПБ А.01.001-2004 [82]
Системи пожежної сигналізації і пожежогасіння	Наявність засобів	Безпека умов праці	ДБН В.2.5-56:2010 [83] НАПБ Б.03.001-2004 [84]
Експлуатація обладнання під тиском	Рівень тиску	Безпека умов праці	ДНАОП 0.00-1.07-94 [85]

Для зменшення дії шкідливих виробничих факторів передбачаються наступні заходи:

- все обладнання та робочі місця зі застосуванням шкідливих речовин оснащуються системами витяжної вентиляції, що забезпечує вміст шкідливих речовин у повітрі робочої зони нижче ГДК, регламентованих державними стандартами та санітарними нормами;

- виробничий персонал допускається до роботи тільки у спецодязі, спецвзутті та індивідуальних засобах захисту, що регламентується відповідними виробничими інструкціями.

- все обладнання, що має електропривод та силове електрообладнання має захисне заземлення або занулення;
- усі рухомі частини виробничого обладнання мають огорожу;
- робочі місця обладнані аптечками першої допомоги;
- технологічний процес проводиться тільки за повної справності та працездатності виробничого обладнання та КВП;
- для зменшення дії на персонал виробничого шуму вентиляційне обладнання оснащується звукозахисною ізоляцією та встановлюється на технічному поверсі.

При виникненні аварійної ситуації, що безпосередньо чи потенційно загрожує персоналу або навколишньому середовищу, персонал виконує заходи, що передбачені інструкціями підприємства, наприклад «Інструкція з протиепідемічного режиму та охорони навколишнього середовища» підприємства ПрАТ НВК «ДІАПРОФ-МЕД» [54]

Пожежна безпека виробничих приміщень забезпечується проєктними та інженерно-технічними рішеннями, що спрямовані на запобігання виникненню пожежі та вибуху та забезпечення вибухопожежної та пожежної безпеки:

- приміщення з різною пожежною небезпекою розділяють протипожежними перегородками з гіпсокартону із заповненням мінеральними плитами (границя вогнестійкості 1,25 години), та протипожежними дверима (границя вогнестійкості 0,6 години);
- у коридорах на шляхах евакуації персоналу передбачається наявність протидимових та протипожежних перегородок;
- розміщення пожежних кранів виконують у нішах пожежних шаф, на шляхах евакуації персоналу;
- електропроводка виконується з кабелів з мідними жилами в оболонці, що мінімізує горіння;
- проходки кабелів та проводів крізь стіни виконується в обрізах сталевих труб та закриваються вогнетривкою сумішшю.

Згідно з національними екологічними вимогами щодо експлуатації підприємств, встановлених низкою нормативно правових документів, підприємства зобов'язані вживати ефективні заходи з дотримання технологічного режиму і виконання вимог з охорони природи, раціонального використання і відтворення природних ресурсів, оздоровлення довкілля. Підприємства також повинні забезпечити дотримання встановлених нормативів якості довкілля на основі дотримання затверджених технологій, впровадження екологічно безпечних технологій і виробництв, надійної й ефективної роботи очисних споруд, установок і засобів контролю, знешкодження й утилізації відходів [72].

Кількість технологічних та вентиляційних викидів в атмосферу, відповідно до технології, не значна і не чинить негативний вплив на оточуюче середовище. Загальна кількість стоків від виробництва складає 15 - 18 м³/добу. Виробнича каналізація проектується для відведення стоків від технологічного обладнання в окремий колодязь міської мережі господарчо-побутової каналізації для здійснення контролю за складом та концентрацією стоків, які не перевищують гранично допустимі концентрації (ГДК) для їх скидання відповідно до Правил приймання стічних вод до систем централізованого водовідведення та Правил контролю якості води водойм і водотоків [86, 87].

Газоподібні викиди регламентуються відповідно до Державних санітарних правил охорони атмосферного повітря населених місць (від забруднення хімічними та біологічними речовинами) та стандарту з Охорони природи. Класифікація викидів по складу [88, 89]. Передбачені заходи забезпечують додержання гігієнічних нормативів допустимого вмісту забруднюючих речовин в атмосферному повітрі відповідно до ГДК, орієнтовних безпечних рівнів діяння (ОБРД) та гранично допустимого забруднення (ГДЗ) у повітрі, що становить 0,8 ГДК; 0,8 ОБРД; 0,8 ГДЗ. Додержання ГДК, ОБРД чи ГДК оцінюється з урахуванням трансформації речовин в атмосфері та фонового забруднення діючих, тих, що будуються, та намічених для будівництва об'єктів [88].

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		123

Система управління якістю навколишнім середовищем на підприємстві – частина загальної системи адміністративного управління, яка включає організаційну структуру, планування, відповідальність і звітність, методи, процеси та ресурси, необхідні для розробки, впровадження і реалізації природоохоронних заходів. Система державної звітності (входить в систему обліку в галузі охорони довкілля), згідно з ЗУ «Про державну статистику» [90], що здійснюється підприємствами, установами й організаціями, діяльність яких пов'язана з природокористуванням і впливом на довкілля. Відповідну статистичну інформацію підприємства надають органам Державної служби статистики України та його територіальному органам, задля контролю показників [72].

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		124

ВИСНОВОК

1. У проєкті виробництва субстанції моноклональних антитіл специфічних до поверхневого білка HBsAg вірусу гепатиту В обрано використовувати основним продуцентом штам гібридомних клітин, отриманих шляхом злиття мієломних мишачих клітин Sp 2/0 та спленоцитів мишей лінії Balb/c.

2. Проаналізовано стандартні методи отримання гібридних клітин, що включають довготривалу імунізацію лабораторних тварин, нарощування культури з подальшим виділенням необхідного клону. Враховуючи, що виділення штаму гібридом коштовний, довготривалий та не завжди успішний процес, технологічно вигідно використовувати готові штами продуценти, з подальшим відновленням культури та нарощуванням інокуляту. Серед виділених штамів, доцільно обрати штам 95E1 із константою афінності $4 \cdot 10^{10}$ моль/л, титром у культуральній рідині 1:1000 та ізотопом антитіл Ig G_{2a}.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні ознаки продуценту, високі культуральні показники забезпечуються іммобілізацією клітин на поверхні напівпроникної мембрани та перфузійним типом подачі безсироваткового DMEM середовища. У процесі виробничого біосинтезу необхідно контролювати оптимальні параметри культивування: температура 37°C, рівень pH=7,3; вологість 95%, вміст вуглекислого газу до 5%, час культивування 8 діб, витрата поживного середовища 12 л/год; аерація – витрата кисню 0,06 л/год.

4. Відповідно до культуральних особливостей продуцента та фізико-хімічних показників кінцевого продукту, масове напрацювання продукту здійснюється шляхом нарощування культурального супернатанта у мембранних біореакторах половолоконного типу. На основі наявної моделі біореактору, було проведено технологічний, конструкційний та гідравлічний розрахунки з метою модернізації конструкції апарату та підвищення виробничих показників.

					<i>ДП 6123.00.000 ПЗ</i>		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Шебеда Д. С.			<i>ВИСНОВОК</i>	Стадія	Арк.
Конс.							125
							135
Керівн.		Дзигун Л. П.				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ</i>	
Затв.							

5. Для повномасштабного виробництва слід використовувати автоматизовані установки, що вміщують від 6 до 10 картриджів з одночасним культивуванням.

6. Згідно з технологічним регламентом і вимогами якості та сертифікації готового продукту, розроблено технологічну та апаратурні схеми виробництва субстанції моноклональних антитіл. Суспендована в буферному розчині з додаванням кріоконсервантів імуноглобулінова фракція міститься в 1 мл ампулах та зберігається при мінусових температурах.

					ДП 6123.00.000 ПЗ	А
Зм	Арк	№ докум	Підпис	Дата		126